



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

## **DISERTASI**

# **EFEK PROTEKSI EKSTRAK TERPURIFIKASI DAUN SURIAN (Toona Sureni (BL) MERR) TERHADAP DISFUNGSI SEL ENDOTEL PADA TIKUS HIPERKOLESTEROLEMIA**



**SUHARTI**  
**07 301 003**

**PROGRAM**  
**PASCASARJANA**  
**UNIVERSITAS ANDALAS**  
**PADANG 2013**

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis persembahkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan bimbingan-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi berjudul **“Efek Proteksi Ekstrak Terpurifikasi Daun Surian (*Toona sureni* (Bl) Merr.) terhadap Disfungsi Sel Endotel Tikus Hiperkolesterolemia”**.

Selama penelitian sampai tersusunnya disertasi ini penulis telah banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Dr.dr. Yanwirasti, PA selaku promotor dan juga sebagai ketua Program S 3 Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Andalas yang telah dengan sabar dan ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dan juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.
2. Prof. Dr.dr. Ellyza Nasrul Sp PK (K), PA selaku Ko promotor I yang telah dengan sabar dan ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.
3. Prof. Dr. Dachriyanus, Apt selaku Ko promotor II dan mantan Dekan yang telah membuka peluang bagi penulis untuk meneruskan pendidikan Doktor dan mengarahkan dan



yang telah membuka peluang bagi penulis untuk meneruskan pendidikan Doktor dan mengarahkan dan bimbingannya dan juga dukungan moril dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.

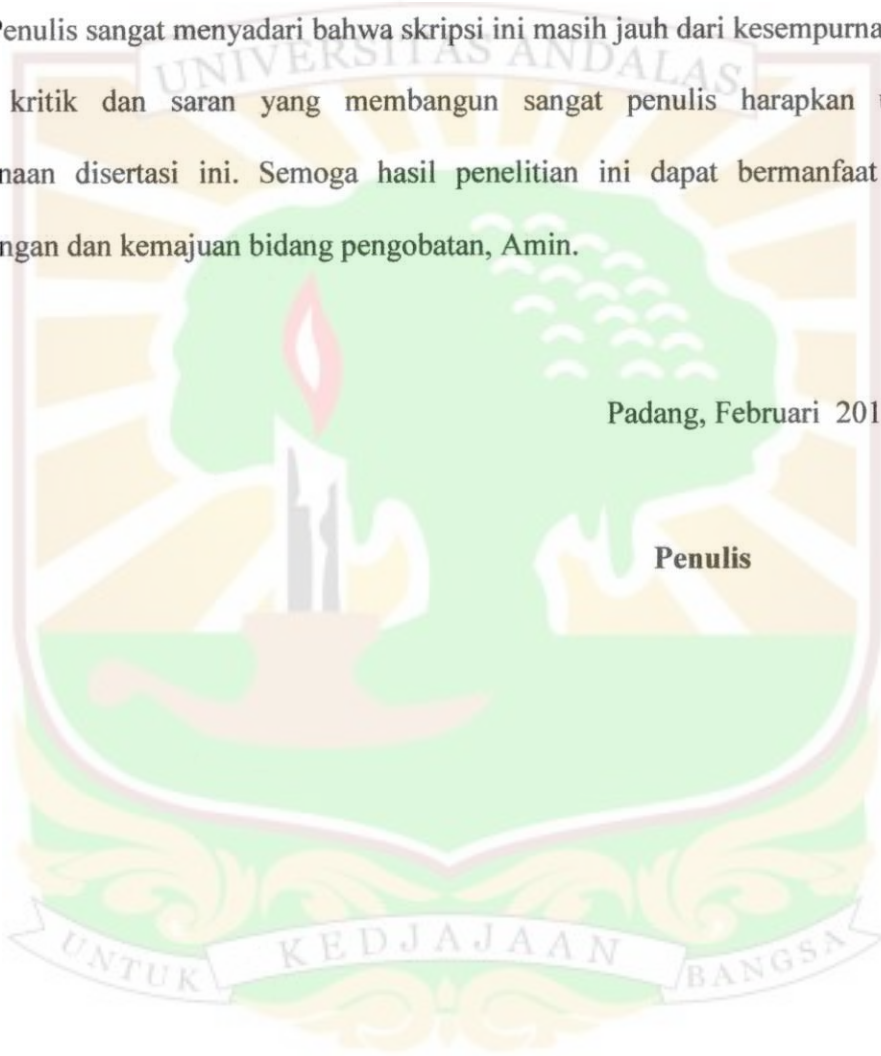
4. Rektor Universitas Andalas yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti kuliah di Program Pasca Sarjana di Universitas Andalas.
5. Mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas Prof. Dr. Ir. Novirman Jamarun, MSc yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk mengikuti program ini
6. Dekan Fakultas farmasi Dr. Muslim Suardi, MSi, Apt yang masih memerikan izin bagi penulis untuk melanjutkan mengikuti kuliah di Program Pasca Sarjana di Universitas Andalas.
7. Kepada seluruh staf dosen di Program Pascasarjana Universitas Andalas khususnya program S 3 Ilmu Kedokteran yang tidak dapat diseutkan namanya satu persatu yang memberikan bekal ilmiah untuk persiapan penyelesaian disertasi ini.
8. Kepala Lab Biomedik, Kepala Lab Biokimia FKUA, Kepala Lab Struktur Perkembangan Hewan Jurusan Biologi FMIPA UA, Kepala Lab Farmakologi, Lab Sentral, Lab Biota Fakultas Farmasi UA yang telah memberi izin kepada peneliti untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin sehingga semua data penelitian ini bisa diperoleh.

9. Semua pihak yang telah membantu dari awal sampai selesainya penulisan skripsi ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat, hidayah, kesehatan dan ampunan-Nya kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaan disertasi ini. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan dan kemajuan bidang pengobatan, Amin.

Padang, Februari 2013

**Penulis**





## RINGKASAN

### EFEK PROTEKSI EKSTRAK TERPURIFIKASI DAUN SURIAN (*Toona sureni* (BL) MERR.) TERHADAP DISFUNGSI SEL ENDOTEL TIKUS HIPERKOLESTEROLEMIA

SUHATRI

Aterosklerosis merupakan masalah yang semakin meningkat pada saat ini, karena memiliki resiko yang tinggi untuk terjadi penyakit jantung koroner (PJK). Penyakit jantung koroner (PJK) menjadi penyebab utama kematian dewasa ini. Badan Kesehatan Dunia (WHO) mencatat lebih dari 7 juta orang meninggal akibat PJK di seluruh dunia pada tahun 2002. Angka ini diperkirakan meningkat 11 juta orang pada tahun 2020 (Kumar, 2007). Hasil survey yang dilakukan Departemen Kesehatan RI menyatakan prevalensi PJK di Indonesia tahun ke tahun terus meningkat. Hasil Riskesdas tahun 2007 menunjukkan PJK menempati peringkat ke-3 penyebab kematian setelah stroke dan hipertensi. Angka kejadian penyakit jantung koroner berdasarkan data Riset kesehatan dasar (Riskesdas) Kementerian Kesehatan 2007, ada sebanyak 7,2%. Aterosklerosis adalah perubahan pada lapisan intima arteri terutama arteri besar, yaitu terjadi penimbunan lemak yang disebut dengan plak. Plak ini kemudian akan membesar dan menyebabkan arteri kehilangan elastisitasnya sehingga lumen pembuluh darah menjadi lebih sempit dan menghambat kelancaran aliran darah menuju jaringan (Hackam, 2006; Brown and Goldstein, 2008; Robert, 2008).

Faktor resiko pembentukan aterosklerosis dapat dibagi 2 kelompok yaitu faktor yang dapat dikendalikan dan faktor yang tidak dapat dikendalikan. Salah satu faktor yang dapat dikendalikan adalah faktor hiperkolesterol. Data penelitian menunjukkan bahwa dengan meningkatnya kadar kolesterol diatas 180 mg/dL, resiko penyakit aterosklerosis juga meningkat dan peningkatan akan lebih cepat jika kadarnya melebihi 240 mg/dL.

Hiperkolesterol dapat menyebabkan molekul low density lipoprotein (LDL) mudah teroksidasi, sehingga terbentuk gugus hidroksil pada sel endotel dan otot polos pembuluh darah. Radikal hidroksil ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (polyunsaturated Fatty Acid/PUFA) yang merupakan struktur dari membran sel termasuk sel endotel sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang akan menghasilkan peroksidasi lipid. Low density lipoprotein teroksidasi dan lipid peroksid yang terbentuk merusak sel endotel pembuluh darah dan terjadilah disfungsi sel endotel (Lawrence, 2006; Weinberg, 2004; Robert, 2008; Robert, 2009). Hiperkolesterol memudahkan LDL melekat ke dinding pembuluh darah dan menyusup ke dalam intima. Di intima LDL yang mengalami oksidasi, akan difagosit oleh makrofag (monosit yang telah masuk ke dalam intima). Semakin banyak LDL-teroksidasi semakin banyak pula difagosit oleh makrofag yang akan membentuk sel



busa (Nakashima *et al.*, 2007). Sel busa yang terbentuk akan saling berikatan membentuk gumpalan yang makin lama makin besar sehingga membentuk benjolan yang mengakibatkan penyempitan lumen pembuluh darah. Keadaan ini akan semakin memburuk karena saat makrofag memfagosit LDL teroksidasi akan menghasilkan faktor pertumbuhan dan akan merangsang sel-sel otot polos dinding pembuluh darah tunika media untuk masuk ke lapisan tunika intima dan kemudian akan berproliferasi sehingga jumlahnya semakin banyak dan makin mempersempit lumen pembuluh darah. (Hackam, 2006). Pada saat ini banyak sekali obat tersedia yang berasal dari bahan kimia untuk mencegah pembentukan aterosklerosis, tetapi efek samping obat ini banyak pula ditemukan. Oleh karena itu para ahli mulai melirik tanaman yang dapat dijadikan obat.

Salah satu bahan alam yang potensial untuk mencegah disfungsi sel endotel adalah tanaman surian (*Toona sureni* BL Merr) Tanaman surian mengandung zat pengelat. Dari hasil penelitian terdahulu diketahui bahwa daun surian mengandung senyawa flavonoid kuersetin, terpenoid/tetranortriterpenoid yaitu surenon, surenin (Kraus, 1997), steroid, karotenoid, dan metil galat (Ekaprasada, 2010). Fraksinasi etil asetat daun surian ini terbukti memiliki efek antioksidan dengan metode pengikatan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Romi, 2009).

Penelitian ini bersifat eksperimental murni, dengan menggunakan hewan percobaan tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). penelitian bersifat *post test only control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap disfungsi sel endotel tikus hiperkolesterolemia. Hiperkolesterol diinduksi dengan pemberian makanan lemak tinggi (MLT) dan propiltiourasil (PTU). Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar nitrogen mono oksida (NO) juga dikenal dengan sebagai *endothelia derivate relaxing factor* (EDRF), kadar *vascular cell adhesion molecule* (VCAM), tebal dinding aorta dan keadaan lapisan endotel aorta.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kgBB kadar NO nya sama dengan kadar NO(EDRF) tikus kontrol negatif dan secara statistik tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Kadar NO pemberian dosis 5 mg/kg BB diatas kadar NO tikus kelompok kontrol positif ( $p < 0,05$ ) (tikus hiperkolesterol) (tabel 5.5, lampiran 4 tabel 6). Ketebalan dinding pembuluh aortanya sama dengan tebal dinding aorta hewan kontrol negatif dan tebal kedua kelompok ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ), dan ketebalan dinding aorta ini kurang tebal dibandingkan aorta tikus kontrol positif dan tebal ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) (terlihat pada lampiran 4 tabel 12 dan lampiran 5 gambar 2 dan 3). Lapisan endotel pembuluh darah aorta hewan yang diberi ekstrak terpurifikasi daun surian 5mg/KgBB mempunyai nilai total rangking kerusakan nya 8,2, terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel yang tetap utuh. Jika dibandingkan dengan keadaan lapisan endotel aorta tikus kontrol negatif tingkat kerusakaaanya mendekati keadaan lapisan endotel aorta tikus kontrol negatif (nilai rangking kerusakanya 5,00) dan nilai rangking dosis ini jauh lebih kecil dari nilai rangking kerusakan lapisan endotel aorta tikus kontrol positif yang memiliki nilai kerusakan 18,33 (lampiran 3 tabel 14 dan lampiran 5 gambar 6, 7 dan 8). Jika dikaitkan hasil ketiga hasil ini memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 5 mg/kg BB, bersamaan makanan lemak tinggi dan



PTU dapat mencegah terjadi disfungsi sel endotel dan mencegah terjadi aterosklerosis dan ditandai tidak terjadi proliferasi (tebal dinding aorta sama dengan tikus normal) sel otot polos pembuluh aorta dan lapisan endotel masih utuh. Adanya perbaikan kerusakan sel endotelia pemberian dosis 5 mg/kg BB oleh ekstrak terpurifikasi daun surian mungkin disebabkan oleh kandungan asam galat dan senyawa kedua yang terkandung dalam ekstrak terpurifikasi. Dimana kedua senyawa ini dapat mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari LDL

Pemberiaan ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kgBB kadar NO nya rendah dari kadar NO(EDRF) tikus kontrol negatif dan kadar ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Dan kadar NO pemberian dosis ini juga dibawah kadar NO tikus kelompok kontrol positif dan kadar ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) (tikus hiperkolesterol ) (tabel 5.5, lampiran 4 tabel 6). Ketebalan dinding pembuluh aortanya sama dengan tebal dinding aorta hewan kontrol negatif dan tebal kedua kelompok ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ), dan ketebalan dinding aorta ini kurang tebal dibandingkan aorta tikus kontrol positif dan tebal ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) (terlihat pada lampiran 4 tabel 12 dan lampiran 5 gambar 2 dan 3). Lapisan endotel pembuluh darah aorta hewan yang diberi ekstrak terpurifikasi daun surian 10 mg/KgBB nilai total rangking kerusakan nya 11,4, terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel yang tetap utuh. Jika dibandingkan dengan keadaan lapisan endotel aorta tikus kontrol negatif tingkat kerusakaaanya mendekati keadaan lapisan endotel aorta tikus kontrol negatif dengan nilai rangking kerusakanya 5,00. Tetapi jika dibandingkan dengan dengan lapisan endotel tikus hiperkolesterol/kontrol positif nilai rangking ini jauh lebih kecil dari nilai rangking kerusakan lapisan endotel aorta tikus kontrol positif yang memiliki nilai kerusakan 18,33 (lampiran 4 tabel 14 dan lampiran 5 gambar 6, 7 dan 8).Jika dikaitkan hasil ketiga hasil ini memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 10 mg/kg BB, bersamaan makanan lemak tinggi dan PTU tidak dapat mencegah terjadi disfungsi sel endotel ditandai dengan kadar NO yang rendah dari tikus normal tetapi dapat mencegah terjadi aterosklerosis dan ditandai tidak terjadi proliferasi (tebal dinding aorta sama dengan tikus normal) sel otot polos pembuluh aorta dan lapisan endotel masih utuh.

Pemberiaan ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kgBB kadar NO nya rendah dari kadar NO(EDRF) tikus kontrol negatif dan kadar ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Dan kadar NO pemberian dosis ini juga dibawah kadar NO tikus kelompok kontrol positif dan kadar ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) (tikus hiperkolesterol ) (tabel 5.5, lampiran 4 tabel 6). Ketebalan dinding pembuluh aortanya sama dengan tebal dinding aorta hewan kontrol positif dan tebal kedua kelompok ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ), dan ketebalan dinding aorta ini lebih tebal dibandingkan aorta tikus kontrol negatif dan tebal ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) (terlihat pada lampiran 4 tabel 12 dan lampiran 5 gambar 2 dan 3). Lapisan endotel pembuluh darah aorta hewan yang diberi ekstrak terpurifikasi daun surian 20 mg/KgBB nilai total rangking kerusakan nya 18,3, terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel terputus putus dan tidak utuh lagi. Jika dibandingkan dengan keadaan lapisan endotel aorta tikus kontrol positif tingkat kerusakaaanya mendekati keadaan lapisan endotel aorta tikus kontrol positif dengan nilai rangking kerusakanya 22,00, terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel terputus putus dan tidak utuh lagi. Tetapi jika dibandingkan dengan dengan lapisan



endotel tikus kontrol negatif nilai rangking ini jauh lebih besar dari nilai rangking kerusakan lapisan endotel aorta tikus kontrol negatif yang memiliki nilai kerusakan 5,00 terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel yang tidak terputus putus dan utuh (lampiran 4 tabel 14 dan lampiran 5 gambar 6, 7 dan 8). Jika dikaitkan hasil ketiga hasil ini memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 20 mg/kg BB, bersamaan makanan lemak tinggi dan PTU tidak dapat mencegah terjadi disfungsi sel endotel ditandai dengan kadar NO yang rendah dari tikus normal tetapi juga tidak dapat mencegah terjadi aterosklerosis dan ditandai terjadi proliferasi (tebal dinding aorta lebih tebal dari aorta tikus normal) sel otot polos pembuluh aorta dan lapisan endotel terputus putus dan tidak utuh lagi. Disimpulkan pemberian dosis 20 mg/Kg BB toksik terhadap sel endotel (Lu, 1995).

Persentase luas lumen pembuluh darah pada penelitian ini tidak dilakukan karena pada saat pengukuran luas lumen didapat kesulitan pengukuran, karena pembuluh darah hewan uji lingkaran yang tidak beraturan tidak seragam sehingga rata-rata pengukuran mempunyai jarak yang jauh, sehingga pengukuran persentase luas lumen tidak dilakukan untuk mengatasi data yang tidak valid.

Kadar VCAM serum tikus kelompok hewan positif dan kontrol negatif, kadarnya tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Tidak meningkatnya kadar VCAM-1 pada kelompok tikus yang diberi MLT ini diduga karena untuk menginduksi kenaikan kolesterol, juga dipakai propiltiourasil (PTU). Kadar VCAM-1 serum tikus yang diberikan ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB, 10 mg/kg BB tidak dapat diambil kesimpulan apakah ada pengaruh atau tidak karena hasilnya diduga dipengaruhi oleh pemberian PTU. Tidak adanya perbedaan kadar VCAM-1 pada semua perlakuan kecuali pada pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB bukan karena metoda atau reagen rusak, hal ini didasarkan pada kenyataan kadar VCAM-1 pada kelompok tikus yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB rendah dibandingkan yang lain dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Disimpulkan ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB dapat menurunkan kadar VCAM.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan ekstrak terpurifikasi daun pada dosis 5 mg/kg BB efeknya paling baik memproteksi disfungsi sel endotel ditandai dengan dapat meningkatkan kadar NO tikus hiperkolesterol, dan mencegah penebalan dinding aorta dan mencegah kerusakan lapisan endotel. Pemberian Ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kg BB tidak dapat memproteksi disfungsi sel endotel tidak dapat meningkatkan kadar NO tikus hiperkolesterol, tetapi dapat mencegah penebalan dinding aorta dan mencegah kerusakan lapisan endotel. Pemberian Ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB tidak dapat memproteksi disfungsi sel endotel ditandai dengan tidak dapat meningkatkan kadar NO tikus hiperkolesterol, juga tidak dapat mencegah penebalan dinding aorta dan mencegah kerusakan lapisan endotel. Pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) dosis 5 mg/kg BB; 10 mg/kg BB tidak mempengaruhi kadar VCAM serum. Sedangkan dosis 20 mg/kg BB dapat menurunkan kadar VCAM



**SUMMARY**  
**THE PROTECTION EFFECT OF PURIFIED EXTRACT OF SURIAN**  
**LEAVES (*Toona Sureni* BL MERR.) AGAINST ENDOTHELIAL CELL**  
**DYSFUNCTION OF HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS**

Atherosclerosis is an increasing health problem and a risk for coronary heart disease. Coronary heart disease has been one of the primary causes of death. WHO has recorded at least 7 million people were died from the disease in 2002. This number is believed to increase to 11 million in 2020 (Kumar, 2007). A survey conducted by Ministry of Health of Indonesia reported that the prevalence of coronary heart disease is increasing every year in the country. The national research on basic health (Riskesdas) in 2007 showed that the disease was the third leading cause of death after stroke and hypertension with the incidence number of 7.2%. Atherosclerosis is the alteration of the arterial intima as the result of accumulation of fatty materials called plaques. These plaques are accumulated and cause the artery to lose elasticity and narrow the blood vessel and alter the blood stream to the tissues (Hackam, 2006; Brown and Goldstein, 2008; Robert, 2008).

The risk factors for atherosclerosis can be divided into two factors: controllable and uncontrollable factors. One of the controllable factors is hypercholesterol factor. Recent studies showed that the level of cholesterol above 180 mg/dL increases the risk for atherosclerosis, and the risk is even higher when the cholesterol level is above 240 mg/dL.

Hypercholesterol can lead to the oxidation of low density lipoprotein (LDL) that produces hydroxyl group in the endothelial cells and smooth muscle of blood vessel. The hydroxyl radical reacts with polyunsaturated fatty acid (PUFA) which is the component of cell membrane and endothelial cell causing lipid peroxidation. The LDL is oxidized and the lipid peroxide breaks endothelial cells causing endothelial cell dysfunction (Lawrence, 2006; Weinberg, 2004; Robert, 2008; Robert, 2009). Hypercholesterol cause the LDL to easily stick to blood vessel wall and penetrate the intima. LDL is oxidized in the intima and phagocytosed by macrophages (monocytes inside the intima). The more oxidized intima causes more phagocytosis that produces foam cells (Nakashima *et al.*, 2007). The foam cells stick each other to make a lump that is growing to cause narrowed blood vessel. This is worsening when the phagocytosis of oxidized LDL continues as it produces growth factor and stimulates the smooth muscle of blood vessel wall of tunica media to penetrate tunica intima and then proliferate resulting in more mass that narrows blood vessel lumen (Hackam, 2006). At this time a lot of medications available that comes from chemicals to prevent the formation of atherosclerosis, but the side effects of these drugs found too many. Therefore the experts begin to look for plants that can be used as medicine.

One of natural products potential to prevent endothelial cell dysfunction is of surian Leaves (*Toona sureni* BL Merr.). This plant contains chelating agent. Previous studies have revealed that this plant contains quersetin flavonoid, terpenoids/tetranortriterpenoids which are surenone, surenine (Kraus, 1997), steroids,



carotenoids, and methyl galat (Ekaprasada, 2010). Ethyl acetate fractionation of the leaves exhibits antioxidant activity by means of DPPH radical scavenging assay (Romi, 2009).

This study was conducted experimentally on male white rats (*Rattus novvergicus*) in post-test only control group design. The objective of this study was to determine the protection effect of purified extract of mahogany leaves on the endothelial cell dysfunction of hypercholesterolemic rats. Hypercholesterolemic rats were obtained by high fat diet (HFD) and induction of propylthiouracil (PTU). Parameters observed in this study were the concentration of nitrogen monoxide (NO) known as endothelium-derived relaxing factor (EDRF); the concentration of vascular cell adhesion molecule (VCAM); the thickness of aortal wall and physical properties of its endothelial layer.

The study showed that the purified extract at the dose of 5 mg/kg affect the NO level insignificantly different to that of negative control group ( $p>0.05$ ) but higher than positive control group ( $p<0.05$ ). The thickness of aorta wall from this group was also insignificantly different to that of negative control group ( $p>0.05$ ) but less thick as compared with the positive control group ( $p<0.05$ ). The total damage ranking of endothelial lining of aorta from the group given 5 mg/kg of purified extract was scored 8.20 where the tunica intima and endothelial lining remained unimpaired. This score was close enough when compared to that of negative control group that was scored 5.00 and much lower than positive control group that was scored 18.33. These results confirmed that purified extract of mahogany leaves in the dose of 5 mg/kg concurrently with high fat diet and PTU could prevent the incidence of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis where no cell proliferation was happening in the smooth muscle cell of aorta and unimpaired endothelial cells. The recovery of altered endothelial cells by the extract might be conducted by gallic acid content and another compound in the purified extract where these constituents could prevent the oxidation of LDL.

The concentration of NO from group treated with purified extract in the dose of 10 mg/kg was lower than negative control group and showed significant difference ( $p<0.05$ ). This value was lower than that of positive control group ( $p<0.05$ ). The thickness of aorta wall from this group was also insignificantly different to that of negative control group ( $p>0.05$ ) but less thick as compared with the positive control group ( $p<0.05$ ). The total damage ranking of endothelial lining of aorta from the group given 10 mg/kg of purified extract was scored 11.40 where the tunica intima and endothelial lining remained unimpaired. This score was close enough when compared to that of negative control group that was scored 5.00 and much lower than positive control group that was scored 18.33. These results suggested that purified extract of mahogany leaves in the dose of 10 mg/kg concurrently with high fat diet and PTU could not prevent the incidence of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis where low concentration of NO was found but could prevent atherosclerosis where there was no cell proliferation to the smooth muscle cell of aorta and unimpaired endothelial cells.



The concentration of NO from group treated with purified extract in the dose of 20 mg/kg was lower than negative control group and showed significant difference ( $p < 0.05$ ). This value was also lower than that of positive control group ( $p < 0.05$ ). The thickness of aorta wall from this group was insignificantly different to that of positive control group ( $p > 0.05$ ) but thicker as compared with the negative control group ( $p < 0.05$ ). The total damage ranking of endothelial lining of aorta from the group given 20 mg/kg of purified extract was scored 18.30 where the tunica intima and endothelial lining appeared to be impaired. This level of damage was almost equal to positive control group that was scored 22.00 where the tunica intima and endothelial lining were also damaged. However, this score was much higher than negative control group that was scored 5.00 and the tunica intima and endothelial lining remained unimpaired. These results suggested that purified extract of mahogany leaves in the dose of 20 mg/kg concurrently with high fat diet and PTU could not prevent the incidence of endothelial cell dysfunction where low concentration of NO was found and could not prevent atherosclerosis where the proliferation of smooth muscle cell of aorta was happening and the endothelial lining was damaged. It can be concluded that the extract in the dose of 20 mg/kg might be toxic to the endothelial cells (Lu, 1995).

The determination of lumen area of blood vessel was not performed in this study. This procedure was problematic due to dissimilar section of blood vessel as it was likely to bring in imprecise measure and produce invalid data. The concentration of serum VCAM of both positive and negative control group was not significantly different ( $p > 0.05$ ). The concentration of VCAM-1 was not increased even after the induction of high fat diet, this was probably due to the subsequent induction of propylthiouracil (PTU). The serum VCAM-1 concentration from the groups treated by purified extract in the doses of 5 and 10 mg/kg could not be assumed since there was bias affected by the induction of PTU. There was no significant difference of VCAM-1 concentration in entire groups except for group treated with 20 mg/kg of purified extract where the concentration of VCAM-1 in this group was lower than others ( $p < 0.05$ ). Hence, it can be concluded that the extract at the dose of 20 mg/kg could decrease the concentration of VCAM.

This study conclude that purified extract of surian Leaves at the dose of 5 mg/kg exerts the best protection effect against endothelial cell dysfunction indicated by elevated concentration of NO in hypercholesterolemic rats, and prevent the thickening of blood vessel wall of aorta. The extract at the dose of 10 mg/kg cannot protect endothelial cell dysfunction and cannot increase the concentration of NO, but can prevent the thickening of blood vessel wall of aorta and prevent the damage of endothelial lining. The extract at the dose of 20 mg/kg cannot protect endothelial cell dysfunction and cannot increase the concentration of NO. Moreover, it cannot also prevent the thickening of blood vessel wall of aorta and prevent the damage of endothelial lining. The extract at the doses of 5 and 10 mg/kg do not influence the serum concentration of VCAM. Mean while the dose of 20 mg/kg can decrease the serum VCAM concentration.

*BL Merr*) dosis 5 mg/kg BB; 10 mg/kg BB tidak mempengaruhi kadar VCAM serum ( $p > 0,05$ ). Sedangkan dosis 20 mg/kg BB dapat menurunkan kadar VCAM ( $p < 0,05$ ).

Kata kunci: Ekstrak Terpurifikasi, Disfungsi sel endotel, NO, VCAM, Aterosklerosis.





**ABSTRACT**  
**THE PROTECTIVE EFFECT OF PURIFIED EXTRACT OF SURIAN**  
**LEAVES (*Toona sureni* (BL) MERR) TO ENDOTHELIAL CELL OF**  
**HYPERCHOLESTEROLEMIA RATS**

Atherosclerosis is the raising problem lately, because it has the high risk to lead to coronary heart disease (CHD). The result of the survey that was held by the Indonesia Health Department Ministry State that the prevalence of CHD in Indonesia each year is raising. The "Rikerdas" in 2007 showed that the CHD was at the level of third of the lethal disease and the second was hypertension. Atherosclerosis occurs normally in case of endothelial cell dysfunction. One of the potential natural ingredients to prevent endothelial cell dysfunction is a plant Surian (*Toona sureni* BL Merr). Fractionation of ethyl acetate Surian leaf contains compounds gallic acid. Gallic acid includes natural polyphenolic compounds having an antioxidant.

This research study aims to analyze the effects of purified leaf extract surian protection against endothelial cell function in hypercholesterolemic rats induced by MLT (High Fat Food) and PTU (Propiltiourasil). This research study is purely experimental post-test only control group design. Experimental animals used were male white rats (*Rattus norvegicus*) 75 tail number. These rats grouped into 3 categories for observation levels of NO (Nitric Oxide), levels of VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) and aortic wall thickness and aortic endothelial layer state. And each group is further divided to 5 groups, which comprised the first group as the negative group (normal rats), group II as positive group (MLT rats and PTU); groups III, IV, V is the group of rats that were given MLT and PTU same surian leaf extract purified with a dose of 5 mg / kg, 10mg/kg BW and 20 mg / kg orally for 60 days. Endothelial dysfunction observed by measuring the levels of nitric oxide (NO), and VCAM-1 levels in the serum, and aortic wall thickness and integrity of the cell layer endothelial. NO levels are checked using Griess reagent and VCAM-1 by immunoenzymatic ELISA using a spectrophotometer with Bio-rad.

From the results, purified leaf extract surian (*Toona sureni* BL Merr) not pure gallic acid containing as much as 50.3% and the remaining other compounds that can not be identified. Surian purified leaf extract at a dose of 5 mg / kg BW, the effect is to protect both endothelial cell dysfunction characterized by increased levels of NO can hypercholesterolemia rats ( $p < 0.05$ ), and prevent thickening aorta ( $p < 0.05$ ) and prevent damage endothelial layer. Giving a dose of 10 mg / kg BW can not protect endothelial cell dysfunction can not increase NO levels hypercholesterolemia rats ( $p > 0.05$ ), but it may prevent thickening aorta ( $p < 0.05$ ) and prevent damage to the endothelial layer. Dosing of 20 mg / kg BW can not protect endothelial cell dysfunction characterized by increased levels of NO can not rat hypercholesterolemia ( $p > 0.05$ ), nor can it prevent the thickening aorta ( $p > 0.05$ ) and was not able to prevent damage to the coating endothelium. The award of purified extract of leaves of *Toona* leaf surian *sureni* BL Merr) dose of 5 mg /

kg, 10 mg / kg did not affect serum levels of VCAM ( $p > 0,05$ ). While the dose of 20 mg / kg body weight can reduce levels of VCAM ( $p < 0,05$ ).

**Keywords:** Purified Extract , endothelial cell dysfunction, NO, VCAM, Atherosclerosis.





## DAFTAR ISI

Halaman	
KATA PENGANTAR .....	i
RINGKASAN.....	iv
SUMMARY.....	viii
ABSTRAK.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
DAFTAR ISI .....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
BAB I : PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	9
1.3 Tujuan Penelitian .....	10
1.3.1 Umum .....	10
1.3.2 Khusus .....	10
1.4. Manfaat Penelitian.....	11
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Aterosklerosis .....	12
2.1.1. Epidemiologi .....	12
2.1.2. Patogenesis Pembentukan Ateroma.....	14
2.2. Lipid.....	17
2. 2.1. Klasifikasi Lipid.....	18
2. 2.2. Lemak .....	18
2. 2. 3. Asam Lemak.....	19
2.3.Lipoprotein.....	21
2.3.1. Fungsi Lipoprotein.....	22
2.3.2. Klasifikasi dan komposisi lipoprotein plasma	23
2.3.3. Transportasi lipid dalam tubuh	25
2.4. Kolesterol.....	28
2.5. Endotel .....	30
2.5.1. Fungsi Endothelium .....	31
2.5.2. Disfungsi Endotel .....	33
2.6. Nitrogen Mono Oksida (NO).....	35

2.6.1. Fungsi Biologis Nitrogen mono oksida.....	35
2.6.2. Pengaruh nitrogen mono oksida terhadap kehidupan sel.....	38
2.6.3. Farmakologi nitrogen mono oksida.....	39
2.7. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1).....	39
2.7.1. Struktur VCAM-1 .....	40
2.7.2. Fungsi VCAM-1.....	40
2.7.3. Farmakologi VCAM-1.....	40
2.8. Radikal Bebas.....	42
2.8.1. Efek Radikal Bebas Dalam Tubuh.....	43
2.8.2. Kerusakan Oksidatif pada membran sel. ....	45
2.8.3. Kerusakan oksidatif pada kolesterol.....	49
2.8.4 Kerusakan lipid membran .....	51
2.9. Anti oksidan.....	53
2.9.1. Antioksidan yang bekerja ditingkat sel .....	54
2.9.2. Antioksidan dengan berat molekul rendah yang berasal dari luar tubuh (Antioksidan eksogen). ....	55
2.10. Flavonoid.....	60
2.10.1. Biosintesa Flavonoid.....	61
2.10.2. Klasifikasi flavonoid.....	61
2.10.3. Golongan dan penyebarannya.....	62
2.10.4. Pemeriksaan flavonoid dalam ekstrak etanol .....	63
2.10.5. Bioaktivitas Flavonoid .....	62
2.11. Metil galat .....	65
2. 11.1. Struktur kimia Metil galat.....	65
2.11.2. Sumber.....	65
2.11.3 Bioaktivitas metil galat.....	66
2.11. Tumbuhan Surian ( <i>Toona sureni</i> (Blume) Merr.)... ..	70
2.11.1. Klasifikasi tumbuhan surian ( <i>Toona sureni</i> (Blume) Merr.) .....	70
2.11.2 Morfologi Surian ( <i>Toona sureni</i> (Blume) Mer	70
2.11.3 Ekologi dan Penyebaran .....	71
2.11.4. Kandungan Kimia dan Bioaktivitas.....	72
2.12. Ekstraksi dan Fraksinasi Flavonoid.....	73
2.12.1 Metode Ekstraksi.....	73
2.12.2 Pemisahan dan Pemurnian.....	75
2.12.3. Identifikasi dan Karakterisasi.....	79
2.13. Percobaan Pembentukan Aterosklerosis.....	80
2.14. Enzyme –Linked Immunosorbent Assay (ELISA)... ..	83
2.14.1 Pengukuran NO menggunakan reagen GRIESS .....	84
2.15.2 Pengukuran VCAM-1 dengan reagen GRIESS .....	84
 BAB III : KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA	
PENELITIAN.....	87
3.1. Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian .....	88
3.2. Hipotesa Penelitian.....	89
BAB IV : METODE PENELITIAN.....	91
4.1. Jenis dan desain penelitian .....	91



4.2. Rancangan Penelitian.....	91
4.3. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Tehnik Pengambil Sampel.....	92
4.3.1. Populasi.....	92
4.3.2. Tekhnik pengambilan Sampel .....	93
4.4. Variabel penelitian dan Definisi Operasional Variab	92
4.4.1. Variabel penelitian.....	93
4.4.2. Defnisi Operasional Variabel.....	94
4.5. Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian.....	95
4.5.1. Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian	95
4.5.2. Instrumen Penelitian.....	96
4.6. Persyaratan Etik.....	98
4.7. Pemantapan Mutu.....	98
4.8. Lokasi dan Waktu penelitian. ....	99
4.9. Prosedur penelitian atau Pengumpulan Data.....	101
4.9.1. Kerangka Operasional penelitian proses frksinasi dari Ekstrak Daun Tanaman Daun Surian ( <i>Toona sureni</i> (Blume) Merr.)	101
4.9.2. Kerangka Operasional penelitian Perlakuan Pada Hewan percobaan .....	103
4.9.3. Prosedur penelitian.....	104
4.9.3.1 Isolasi dan pemurnian senyawa polifenol daun surian.....	104
4.9.3.2 Karakterisasi senyawa polifenol ....	105
4.9.3.3 Persiapan hewan percobaan.....	109
4.9.3.4 Penyiapan makanan lemak tinggi...	109
4.9.3.5 Penyiapan suspensi dan dosis Profiltiourasi.....	109
4.9.3.6 Penyiapan Suspensi Propilthiouracyl	110
4.9.3.7 Penentuan kadar NO/EDRF, VCAM dan keadaan lapisan endotel dan ketebalan dinding aorta.....	110
4.10. Analisa data.....	116
BAB V : HASIL PENELITIAN.....	117
5.1 Pemeriksaan senyawa polifenol dari fraksi etil asetat daun surian( <i>Toona sureni</i> BL Merr)	117
5.2. Hasil Pemeriksaan Kadar Kolesterol Serum	119
5.3. Hasil Pengukuran Kadar Oksida Nitrogen (N.O) Serum.....	120
5.4. Hasil Pengukuran Kadar <i>Vascular Cell</i> <i>Adhesion Molecule</i> (Vcam) Serum.....	121
5.5. Hasil Pemeriksaan Lesi Aterosklerosis...	120
BAB VI : PEMBAHASAN.....	126
6.1 pembahasan pemeriksaan senyawa polifenol dari fraksi etil asetat daun surian( <i>Toona sureni</i> <i>BL Merr</i> ).....	126
6.2 Hasil Pemeriksaan Kadar Kolesterol Serum.....	127

6.3 Hasil Pengukuran Kadar Oksida Nitrogen (N.O) Serum.....	129
6.4 Hasil Pengukuran Kadar <i>Vascular Cell Adhesion</i> <i>Molecule</i> (Vcam) Serum.....	131
6.5 Hasil Pemeriksaan Lesi Aterosklerosis.....	134
BAB VII: KESIMPULAN DAN SARAN.....	140
DAFTAR PUSTAKA.....	142
LAMPIRAN.....	154





## DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1.1. Jenis dan komposisi lipoprotein plasma	22
Tabel 5.1 Hasil Pemeriksaan Metabolit Sekunder Fraksi Etil Asetat <i>T.sureni</i>	106
Tabel 5.2 Pemeriksaaan Senyawa Polifenol Dari Fraksi Eti Asetat Daun Surian ( <i>Toona Sureni BL Merr</i> )	106
Tabel 5.3 Kadar kolesterol serum tikus setelah pemberian senyawa Polifenol dari fraksi etilasetat daun surian ( <i>Toona Sureni BL Merr</i> )	108
Tabel 5.4 Kadar nitrogen mono oksida (NO) setelah diberi senyawa Polifenol dari fraksi etilasetat daun surian ( <i>Toona Sureni BL Merr</i> )	109
Tabel 5.5 Kadar VCAM serum setelah diberi senyawa Polifenol dari fraksi etilasetat daun surian( <i>Toona Sureni BL Merr</i> )	110
Tabel 5.6 Tebal Dinding Pembuluh Darah Aorta Setelah Diberi Senyawa Polifenol Dari Fraksi Etilasetat Daun Surian( <i>Toona Sureni BL Merr</i> )	111
Tabel 5.7 Tingkat Kerusakan Sel Endotel Pembuluh Darah Aorta Setelah Diberi Senyawa Polifenol Dari Fraksi Etilasetat Daun Surian( <i>Toona Sureni BL Merr</i> )	112

## DAFTAR GAMBAR

### HALAMAN

Gambar 2.1.2	Pembentukan flak	14
Gambar 2.3.1	Struktur lipoprotein	21
Gambar 2.3	Jalur transportasi lipoprotein eksogen	25
Gambar 2.4	Struktur umum kolesterol	27
Gambar 2.5.1	Fungsi sel endotel	34
Gambar 2.5.2	Ilustrasi disfungsi endotel oleh stres oksidatif	31
Gambar 2.6.1	Ilustrasi peranan NO ( EDRF )	36
Gambar 2.8.2	Mekanisme peroksidasi lipid	46
Gambar 2.8.3	Representasi reaksi inisiasi dan propagasi dari peroksidasi lipid	49
Gambar 2.10	Kerangka dasar senyawa Flavonoid	59
Gambar 2.11	<i>Toona sureni</i> BL. Merr.	64
Gambar 2.14.1	Prinsip Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	76
Gambar 2.14.2	Reaksi kimia pada pengukuran Nitrit dengan Reagen GRIESS.	81



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Gambar tumbuhan surian (*Toona sureni* BL. Merr)

Gambar daun surian (*Toona sureni* BL. Merr)

Lampiran 2. Herbarium Universitas Andalas (ANDA) *T. sureni*

Lampiran 3. Pemeriksaan Ekstrak terpurifikasi dari Subfraksi Fraksi Etil Asetat

Daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)

Lampiran 4. Hasil perhitungan statistik data-data senyawa polifenol dari fraksi etilasetat daun surian (*Toona Sureni* BL Merr)

Lampiran 5. Foto mikroskopis preparat histopatologi pembuluh aorta tikus putih jantan .



## DAFTAR SINGKATAN

APO A	=	Apoprotein A
Apo B-100	=	Apoprotein B-100
APO C	=	Apoprotein C
APO E	=	Apoprotein E
BAA	=	<i>n</i> -Butanol-Asam asetat-Air
BHA	=	Butylated-Hidroxy-Amizol
CD4	=	Cluster of Differentiation 4
CD25	=	Cluster of Differentiation 25
CD106	=	Cluster of Differentiation 106
CETP	=	Cholesterol Ester Transferase Protein
eNOS	=	constitutive- Nitric Oxide Synthase
CRP	=	C-reactive protein
COX-2	=	Cyclooxygenase-2
Cyclic GMP	=	Cyclic Guanocin Mono Phosphat
DPPH	=	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EDHF	=	Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	=	Endothelium Derivate Relaxing Factor
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	=	Endothelium Nitric Oxide Synthase
FAD	=	Flavin adenine dinucleotide
FGF-1	=	Fibroblast Growth Factor.
FMN	=	Flavin mononucleotide
HDL	=	High Density Lipoprotein
HUVECs	=	Human Umbilicalis Venous Endotel Cel
ICAM-1	=	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IC50	=	Inhibition Concentration 50
IDL	=	Intermediate Density Lipoprotein
IL-1	=	Interleukin-1
KCC	=	Kromatografi Cair Cair
KLT	=	Kromatografi Lapis Tipis
LCAT	=	Lecitin Cholesterol Acyl Transferase
LDL	=	Low Density Lipoprotein
LPL	=	Lipoprotein Lipase
LPO	=	Lipid Peroksidasi
LTC4	=	Leucotrien C4
MIC	=	Minimal Inhibition Concentrasion
MLT	=	Makanan Lemak Tinggi
mRNA	=	Messenger RNA
M3MG	=	Methyl-3-O-Metil Gallate
NA	=	Non Adrenergic



NADPH	=	Nicotinamide Adenin Dihidro Phosphate
NC	=	Non Cholinergic
NO	=	Nitrogen mono Oksida
NOS	=	Nitric Oxide Synthase
NF- $\kappa$ B	=	Nuclear Factor-kappa B
PAF	=	Platelet Activating Factor
PAI-1	=	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PGDF	=	Platelet Growth-Derived Factor
PGI <sub>2</sub>	=	Prostaglandin GI <sub>2</sub>
PGD <sub>2</sub>	=	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PJK	=	Penyakit jantung koroner
PUPA	=	Polyunsaturated Fatty Acid
RNS	=	Reactive nitrogen spesies
ROS	=	Reactive oxidative spesies
RS-A	=	Reseptor scavenger-A
SH	=	Sulfhydryl
SOD	=	Superoksida dismutase
tPA	=	Tissue plasminogen activator
TNF- $\alpha$	=	Tumor necrosis factor-alpha
VCAM-1	=	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	=	Very Low Density Lipoprotein



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Aterosklerosis merupakan masalah yang semakin meningkat pada saat ini, karena memiliki resiko yang tinggi terjadi penyakit jantung koroner (PJK). Penyakit jantung koroner (PJK) telah menjadi penyebab utama kematian dewasa ini. Badan Kesehatan Dunia (WHO) mencatat lebih dari 7 juta orang meninggal akibat PJK di seluruh dunia pada tahun 2002. Angka ini diperkirakan meningkat 11 juta orang pada tahun 2020 (Kumar, 2007). Hasil survey yang dilakukan Departemen Kesehatan RI menyatakan prevalensi PJK di Indonesia tahun ke tahun terus meningkat. Hasil Riskesdas tahun 2007 menunjukkan PJK menempati peringkat ke-3 penyebab kematian setelah stroke dan hipertensi. Angka kejadian penyakit jantung koroner berdasarkan data Riset kesehatan dasar Kementerian Kesehatan 2007, ada sebanyak 7,2% (Riskesdas, 2007).

Aterosklerosis adalah perubahan pada lapisan intima arteri terutama arteri besar, yaitu terjadi penimbunan lemak yang disebut dengan plak ateroma pada permukaan bagian dalam arteri. Plak merupakan timbunan lemak yang bercampur dengan jaringan lunak dan kalsium. Plak ini kemudian akan membesar dan menyebabkan arteri kehilangan elastisitasnya sehingga lumen pembuluh darah menjadi lebih sempit dan menghambat kelancaran aliran darah menuju jaringan (Hackam, 2006; Brown and Goldstein, 2008; Robert, 2008).

Faktor resiko pembentukan aterosklerosis dapat dibagi 2 kelompok yaitu faktor yang dapat dikendalikan dan faktor yang tidak dapat dikendalikan. Salah satu faktor yang dapat dikendalikan adalah faktor hiperkolesterol. Data penelitian



menunjukkan bahwa dengan meningkatnya kadar kolesterol diatas 180 mg/dL, resiko penyakit aterosklerosis juga meningkat dan peningkatan akan lebih cepat jika kadarnya melebihi 240 mg/dL.

Hiperkolesterol dapat menyebabkan molekul low density lipoprotein (LDL) mudah teroksidasi, sehingga terbentuk gugus hidroksil pada sel endotel dan otot polos pembuluh darah. Radikal hidroksil ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (polyunsaturated Fatty Acid/PUPA) yang merupakan struktur dari membran sel termasuk sel endotel sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang akan menghasilkan peroksidasi peroksid. LDL teroksidasi dan lipid peroksid yang terbentuk merusak sel endotelium pembuluh darah dan terjadi disfungsi sel endotel (Lawrence, 2006; Weinberg, 2004; Robert, 2008; Robert, 2009).

Hiperkolesterol memudahkan LDL yang memiliki melekat di dinding pembuluh darah dan menyusup ke dalam intima. Di intima LDL akan mengalami oksidasi tahap pertama sehingga terbentuk LDL yang teroksidasi. LDL-teroksidasi akan difagosit makrofag (monosit yang telah masuk ke dalam intima). Semakin banyak LDL-teroksidasi semakin banyak difagosit oleh makrofag dan membentuk sel busa (Nakashima *et al.*, 2007). Sel busa yang terbentuk akan saling berikatan membentuk gumpalan yang makin lama makin besar sehingga membentuk benjolan yang mengakibatkan penyempitan lumen pembuluh darah. Keadaan ini akan semakin memburuk karena saat makrofag memfagosit LDL teroksidasi menghasilkan faktor pertumbuhan dan akan merangsang sel-sel otot polos pada dinding pembuluh darah yang lebih dalam (tunika media) untuk masuk ke lapisan

intima dan kemudian akan berproliferasi sehingga jumlahnya semakin banyak dan makin mempersempit lumen pembuluh darah. (Hackam, 2006).

Jika sel endotel mengalami gangguan oleh berbagai hal seperti *shear stress* hemodinamik, stress oksidatif maupun paparan dengan sitokin inflamasi dan hiperkolesterolemia, maka fungsi pengatur menjadi abnormal dan disebut disfungsi endotel. Pada keadaan ini khususnya terjadi ketidak seimbangan substansi vasoaktif sehingga dapat terjadi hipertensi dan aterosklerosis (Lawrence, 2004; Reiterer *et al.*, 2004; Simionescu, 2007). Sebagai dampak dari stres oksidatif dan perubahan status reaksi redoks lokal terjadi disfungsi endotel mengakibatkan serangkaian fenomena maladaptif yang mengakibatkan terjadinya respons vaskuler yang tidak menguntungkan., seperti gangguan profibrinolitik, yang mengakibatkan tercetusnya proses thrombogenesis (Lawrence, 2004; Reiterer *et al.*, 2004; Simionescu, 2007).

Endotel yang mengalami disfungsi pada permukaanya akan mengekspresikan molekul adesi. seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) (Ley and Huo, 2001) dan *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Yamamoto *et al.*, 2008; Rohatgi, 2009). Disfungsi sel endotel juga mengakibatkan permukaan non-trombogenik berubah menjadi trombogenik, sehingga terjadi aktivasi koagulasi. Sebagai petanda aktivasi koagulasi dapat diperiksa D-dimer, kompleks trombin-antitrombin, fragmen protrombin 1 dan 2 (F1.2) atau fibrin monomer (Barreiro *et al.*, 2002; Furie and Furie, 2005).

Disfungsi sel endotel sering diartikan menurunnya daya vasodilatasi pembuluh darah, karena terjadi penurunan produksi dan bioaktivitas faktor vasodilatasi lokal, khususnya nitrogen mono oksida (NO) atau nama lainnya



*Endothelium Derivate Relaxing Factor* (EDRF) (Lawrence, 2004; Ghasemi *et al.*, 2007; Simionescu, 2007), dan juga terganggu fungsi normal endotel yang lain, seperti interaksinya dengan leukosit, platelets dan faktor-faktor pengatur lain. Disfungsi sel endotel diyakini awal perkembangan aterosklerosis (Dessy and Ferron, 2004; Reiterer *et al.*, 2004; Rohatgi *et al.*, 2009). Faktor risiko lain, seperti hipertensi, merokok, diabetes, umur, obesitas, displipidemia, dan *sedentary life style*, semuanya dapat menyebabkan disfungsi endotel. Proses sistemis yang menginduksi disfungsi endotel adalah melibatkan aktivasi *intracellular oxidative signaling*, juga terjadi oksidasi LDL (Reiterer *et al.*, 2004; Gustafsson *et al.*, 2007; Simionescu, 2007).

Telah dipublikasikan sejumlah bukti yang mengindikasikan adanya percepatan degradasi NO akibat dari reaktif oksidatif spesies (ROS) dan juga terjadi penurunan bioavailabilitas NO akibat disfungsi endotel. Terjadi gangguan vaskuler karena kelebihan produksi ROS, diantaranya anion superoksida dan LDL (*low density lipoprotein*) teroksidasi. Penurunan antioksidan diduga bertanggung jawab terhadap peningkatan degradasi NO. Anion superoxide dapat secara langsung menginaktifkan NO melalui proses reaksi oksidasi membentuk peroksinitrit, yang merupakan komponen radikal bebas yang sangat kuat (Xi *et al.*, 2007).

Peningkatan produksi superoksida pada pembuluh darah manusia, telah dilaporkan dapat mengganggu kemampuan vasorelaksasi yang diperantarai oleh NO. Pembersihan superoksida dapat mengembalikan pengaturan vasomotor yang tergantung endotelium pada binatang coba yang mengalami aterosklerosis. Pada penderita dengan penyakit jantung koroner, aktifitas superoxide dismutase (SOD)

endotel secara nyata mengalami peningkatan, sehingga mengakibatkan disfungsi endotel koroner (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Radikal bebas dalam tubuh diantaranya anion *superoksida*, *radikal hidroksi*, *hydrogen peroksida*. Radikal bebas ini sangat erat kaitannya dengan penyakit aterosklerosis (Xi, 2007), dan diabetes. Pada pasien hipertensi terlihat meningkat kadar superoksida, hidrogen peroksida dan peroksida lipid ini. Efek peningkatan ini sangat erat hubungannya dengan kerusakan sel endotel pembuluh darah, NO yang dihasilkan sel endotel berkurang. Nitrogen mono oksida ini diketahui bertanggung jawab pada proses relaksasi otot pembuluh darah (Dessy, 2004; Simionescu, 2007).

Nitrogen mono oksida (NO) berperan pada hemostasis pembuluh darah yaitu menginhibisi kontraksi otot polos pembuluh darah, pertumbuhan, agregasi platelet, dan adesi leukosit pada endotel. Pada keadaan aterosklerosis, diabetes, atau hipertensi sering mempengaruhi ketersediaan NO dalam darah (Dessy and Ferron, 2004). Mengonsumsi garam jumlah tinggi memperlihatkan pengurangan produksi NO, walaupun bioavailabilitas tak teratur. NO bekerja melalui stimulasi guanylate cyclase yaitu enzim heterodimerik dan selanjutnya terbentuk cyclic GMP. Cyclic GMP mengaktifasi protein kinase G, yg menyebabkan defosforilasi gugus fosfat pada rantai miosin (karena inaktivasi) enzim myosin kinase dan terjadi defosforilasi rantai miosin, menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah dan menyebabkan vasodilasi (Howard, 2007).

Pemahaman peran stres oksidatif pada proses disfungsi endotel memberikan implikasi yang dapat dilakukan untuk memperbaiki/ mengembalikan fungsi endotel vaskuler. Hasil penelitian preklinis telah memberikan bukti tentang



peran antioksidan terhadap fungsi endotel (Lawrence, 2004; Reiterer, 2004). Vitamin C, suatu *water-soluble scavenger* dari radikal bebas yang kuat, dapat mencegah kerusakan sel endotel dan dapat menurunkan adesi monosit terhadap sel endotel, menghambat oksidasi LDL, mengurangi inaktivasi NO, dan merangsang aktifitas eNOS melalui regenerasi dari BH4. Vitamin E, suatu fat-soluble inhibitor, juga menghambat adesi leukosit dan oksidasi kolesterol LDL secara *in vitro*. Beberapa studi klinis mengvalidasi efek antioksidan vitamin C. Hasilnya menunjukkan bahwa efek vitamin C dapat memperbaiki fungsi endotel pada penderita dengan penyakit kardiovaskuler. Namun manfaat penambahan vitamin E tampak agak sulit dibuktikan, walaupun terdapat adanya perbaikan efek vasodilatasi yang tergantung senyawa yang dihasilkan endotel. Selain itu vitamin E juga dapat menurunkan marker serum dari peroksidase lipid. Namun demikian juga terdapat sejumlah penelitian yang gagal membuktikan hasil yang sama terhadap perbaikan disfungsi endotel (Halliwell *et al.*, 2005; Kumalaningsih, 2007).

Pengobatan hiperkolesterolemia pada saat ini lebih ditujukan untuk menurunkan kolesterol dengan menggunakan obat sintesis seperti: kolestipol, kolestiramin, statin /lovastatin, gemfibrozil, klofibrat dan niasin. Obat-obat ini harganya sangat mahal karena bahan dasarnya masih di impor dari luar negeri, sehingga menghabiskan devisa Negara. Disamping itu pada beberapa individu, obat yang beredar dipasaran fenofibrat dapat menimbulkan konstipasi, haemorrhoid. Penggunaan niasin menyebabkan takifilaksis, pruritus, akantosis nigrikans. Gemfibroil menyebabkan gangguan otot, aritmia jantung, meningkat enzim aminotransferase atau alkalinfosfatase, hemodelusi, peningkatan efek

antikoagulan kumarin, peningkatan empedu. Kolestipol dan kolestiramin menyebabkan konstipasi dan perut kembung, jantung terasa terbakar, hiprotrombinemia, kadang terjadi malabsorpsi asam folat. Lovastatin dan simvastatin dapat menyebabkan peningkatan enzim aminotransferase lebih tiga kali normal, peningkatan aktivitas kreatinin kinase, rabdomiolisis. (Issandou , 2006; Brown and Goldstein , 2005).

Berdasarkan hal diatas para peneliti, terutama di Negara ASEAN menggalakkan penelitian dari bahan alamiah yang terdapat di beberapa Negara ini. Untuk menurunkan kenaikan radikal bebas maka diperlukan penelitian mengenai tumbuhan yang meniadakan radikal bebas. Senyawa antioksidan alami terdiri dari senyawa fenolik, polifenol yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, asam galat, kumarin, tokoferol, dan asam organik polifungsional (Pratt, 1992). Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katesin, dan kalkon. Senyawa polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat bereaksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, (d) Peredam terbentuknya singlet oksigen (Aqil *et al.*, 2006).

Flavonoid adalah sekelompok besar senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman seperti dalam daun singkong, buah apel, anggur dan lain lainnya. Aktivitas biologis flavonoid sangat luas diantaranya sebagai antioksidan, memiliki efek vasodilatasi. Flavonoid juga memiliki efek menguntungkan pada sistem kardiovaskular, yaitu menurunkan tingkat oksidasi LDL (*Low Density Lipid*), sehingga akumulasi kolesterol pada pembuluh darah berkurang, disamping itu mencegah agregasi platelet darah sehingga mengurangi risiko terbentuknya



gumpalan darah yang merupakan penyebab stroke dan menurunkan inflamasi dan respon imun tubuh yang dapat menyebabkan aterosklerosis (Lotito and Frei 2006). Flavonoid kuersetin menurunkan resiko penyakit kardiovaskular dengan menstabilkan dan memproteksi sel endotel dari stress oksidatif dan antiinflamasi yang diinduksi dengan asam linoleat. (Reiterer *et al.*, 2004).

Salah satu bahan alam yang potensial untuk mencegah disfungsi sel endotel adalah tanaman surian. Tanaman surian (*Toona sureni* BL Merr) banyak tumbuh diberbagai daerah di Indonesia, yang telah banyak dijadikan sayur pada beberapa daerah di Sumatra Barat. Oleh masyarakat penggunaannya dengan cara meminum air rebusan daun yang ditujukan untuk mengobati berbagai penyakit antara lain penyakit diare, disentri, demam dan juga sebagai adstringen. Tanaman surian ini secara tradisional telah digunakan untuk mengembalikan kekuatan ibu-ibu habis melahirkan. Hasil skrining farmakodinamik yang telah dilakukan oleh di Fakultas Farmasi menyatakan ekstrak etanol daun suriaan ini memiliki efek penekanan sistim saraf pusat, parasimpatomimetik, relaksasi otot, dan simpatolitik (Fairus 1996).

Tanaman surian mengandung zat pengelat (Sastroamidjoyo, 2001). Dari hasil penelitian terdahulu diketahui bahwa daun surian mengandung senyawa flavonoid kuersetin (Ifmaily 1996), terpenoid/tetranortriterpenoid yaitu surenon, surenin (Kraus, 1997), steroid, karotenoid, dan metil galat (Ekaprasada, 2010). Fraksinasi etil asetat daun surian ini terbukti memiliki efek antioksidan dengan metode pengikatan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Romi, 2009).

Berdasarkan uraian diatas dan efek samping yang disebabkan obat penurun kolesterol, dan banyak fakta menyatakan pencegahan tentu jauh lebih baik dari

pengobatan, dengan adanya aktivitas antioksidan polifenol yang terdapat dalam sub fraksi etilasetat daun surian (*Toona surenin* BL Merr), bersamaan dengan kecendrungan global untuk kembali ke alam dan dalam rangka menggali potensi tumbuhan obat Indonesia khususnya tanaman surian, perlu dilakukan pemurnian fraksi etil asetat ini, dan penelitian ini dilanjutkan dengan menguji efek proteksinya terhadap kerusakan sel endotelia pada tikus keadaan hiperkolesterolemia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Apa senyawa utama yang terkandung pada ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) ?
- b. Apakah ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kadar EDRF (NO) pada tikus hiperkolesterolemia.
- c. Apakah ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kadar VCAM-1 pada tikus hiperkolesterolemia.
- d. Apakah ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap perobahan tebal dinding pembuluh aorta tikus hiperkolesterolemia .
- e. Apakah ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kerusakan lapisan endotel aorta tikus hiperkolesterolemia.



### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr.) terhadap disfungsi sel endotel pada tikus hiperkolesterolemia.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a). Mengidentifikasi senyawa yang terkandung pada ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr).
- b). Membuktikan efek ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kadar EDRF (NO) pada tikus hiperkolesterolemia.
- c). Membuktikan efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kadar *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) pada tikus hiperkolesterolemia.
- d). Membuktikan efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap perubahan ketebalan dinding pembuluh aorta tikus hiperkolesterolemia.
- e). Membuktikan efek ekstrak terpurifikasi terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kerusakan lapisan endotel aorta tikus hiperkolesterolemia.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Pengembangan Ilmu Pengetahuan.

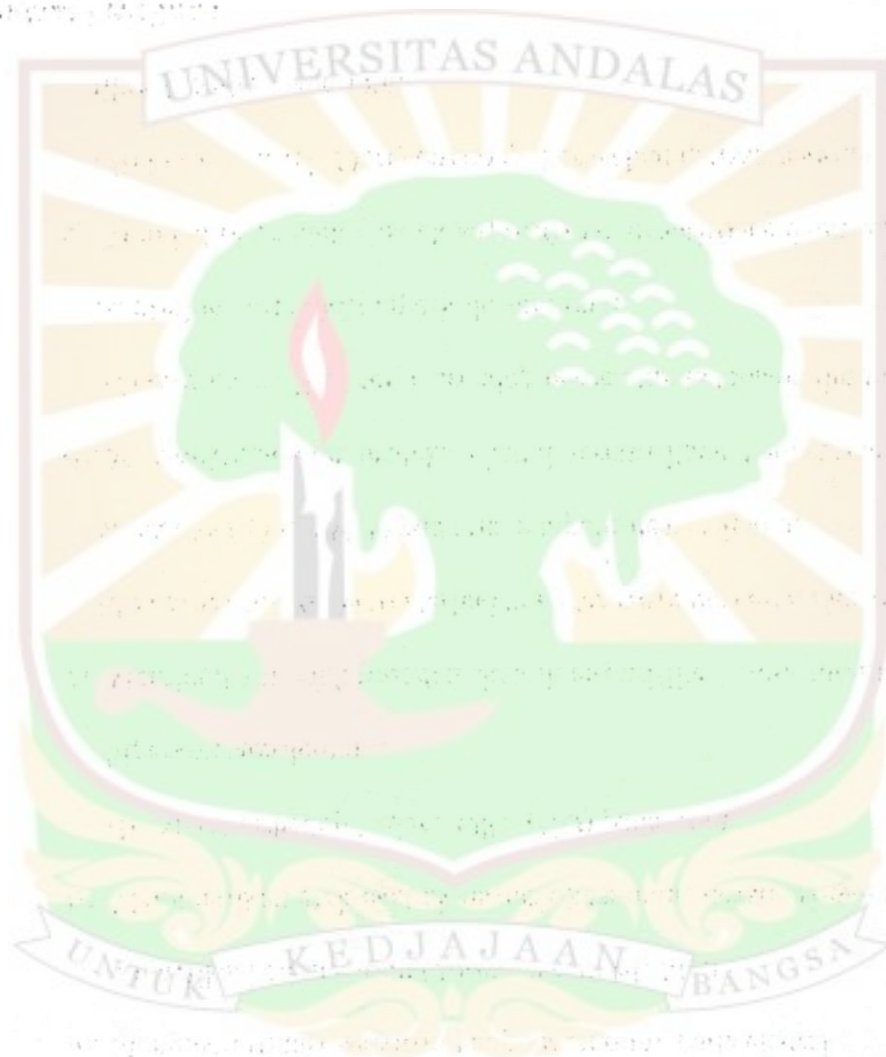
Bermanfaat bagi pengembangan ilmu farmasi yaitu mendapatkan obat fitofarmaka yang memiliki aktivitas antioksidan baru yang dapat mencegah

kegiatan ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.

Penelitian ini akan dilaksanakan pada tanggal 10-12 Desember 2019.

Penelitian ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.

Penelitian ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.



Penelitian ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.

Penelitian ini akan dilaksanakan pada tanggal 10-12 Desember 2019.

Penelitian ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.

Penelitian ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.

Penelitian ini akan dilaksanakan di lingkungan Universitas Andalas.



kerusakan sel endotel dan mengurangi resiko penyakit hipertensi dan aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular lainya.

#### **1.4.2 Kepentingan Masyarakat**

Masyarakat dapat menggunakan daun surian sebagai obat alternatif yang efektif, murah, aman dan mudah didapatkan yang dapat digunakan untuk mencegah kerusakan sel endotel dan mengurangi resiko penyakit hipertensi dan aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular lainya.

#### **1.4.3 Terapan.**

Dapat dipertimbangkan oleh dokter sebagai obat pencegah penyakit kardiovaskular yang disebabkan oleh hiperkolesterol.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Aterosklerosis**

Aterosklerosis adalah perubahan pada lapisan intima arteri terutama arteri besar, yaitu terjadi penimbunan lemak yang disebut dengan plak ateroma pada permukaan bagian dalam arteri. Plak merupakan timbunan lemak yang bercampur dengan jaringan lunak dan kalsium. Plak ini kemudian akan membesar dan menyebabkan arteri kehilangan elastisitasnya sehingga lumen pembuluh darah menjadi lebih sempit dan menghambat kelancaran aliran darah menuju jaringan (Hackam, 2006; Brown and Goldstein, 2005; Robert, 2008).

##### **2.1.1 Epidemiologi**

Telah ditemukan beberapa faktor yang dikenal sebagai faktor resiko yang meningkatkan kerentanan individu terhadap terjadinya aterosklerosis.

Faktor resiko ini dapat dibagi 2 (Brown and Goldstein, 2005; Robert, 2008) yaitu:

Faktor yang tidak dapat dikendalikan

a). Usia.

Kerentanan seseorang terhadap aterosklerosis meningkat dengan bertambahnya usia. Penyakit ini menunjukkan gejala klinis pada usia diatas 40 tahun.

b). Jenis kelamin.

Pria lebih rentan terkena aterosklerosis dibandingkan wanita sebelum monopause dan akan menjadi sama rentannya setelah monopause. Hal ini mungkin disebabkan pada wanita ada hormon estrogen yang melindungi terhadap terjadinya aterosklerosis.



c). Riwayat keluarga.

Riwayat keluarga yang positif mengidap penyakit jantung coroner, seperti saudara atau orang tua yang menderita penyakit ini sebelum usia 40 tahun meningkatkan kemungkinan timbulnya aterosklerosis prematur.

Faktor yang dapat dikendalikan :

a). Faktor mayor

1). Hiperkolesterolemia

Data penelitian menunjukkan bahwa dengan meningkatnya kadar kolesterol diatas 180 mg/dL, resiko penyakit aterosklerosis juga meningkat dan peningkatan akan lebih cepat jika kadarnya melebihi 240 mg/dL.

2). Hipertensi

Tingginya tekanan darah merangsang terjadi peningkatan resiko aterosklerosis. Resiko meningkat sejalan dengan parahnya hipertensi. Oleh sebab itu dianjurkan agar tekanan darah dibawah 140/90 mmHg, berapapun usia seseorang. Hipertensi menyebabkan disfungsi endotel dalam menginisiasi proses aterogenesis. Pada arteri normal, platelet dan monosit bersirkulasi bebas, terjadi pembentukan NO yang mencegah oksidasi LDL dan mempertahankan penurunan tonus vaskuler. Pada keadaan hipertensi, mikrovaskuler mengalami ketidakseimbangan faktor endotelial, penurunan aktivitas NO, peningkatan Angiotensin II dan peningkatan aktivitas endotelin yang merusak sel endotel pembuluh darah. ANG-II ini menyebabkan peningkatan tonus pembuluh darah dan hipertrofi tunika media, sehingga meningkatkan tahanan pembuluh darah sistemik dan merangsang vasokonstriksi. Ini menyebabkan adesi dan

migrasi monosit, serta pembentukan sel busa. Akhirnya terjadi pembentukan plak aterosklerotik (Mc. Cance, *et al*, 2006).

### 3). Merokok

Hasil penelitian membuktikan bahwa merokok satu bungkus sehari akan meningkatkan resiko aterosklerosis tiga kali lipat dibandingkan dengan orang yang tidak pernah merokok. Efeknya tidak permanen sehingga orang yang tidak merokok lagi akan mempunyai resiko rendah, sama seperti orang yang tidak merokok. Merokok menyebabkan stimulasi sistem saraf simpatis oleh nikotin, penggeseran O<sub>2</sub> yang terikat dalam hemoglobin oleh CO<sub>2</sub>, pembentukan radikal-radikal bebas, reaksi imunologis langsung pada dinding pembuluh darah, meningkatnya adhesi trombosit dan meningkatnya permeabilitas endotel terhadap lemak sehingga terbentuk plak aterosklerosis ( Price&Loraine, 2006).

### b). Faktor minor

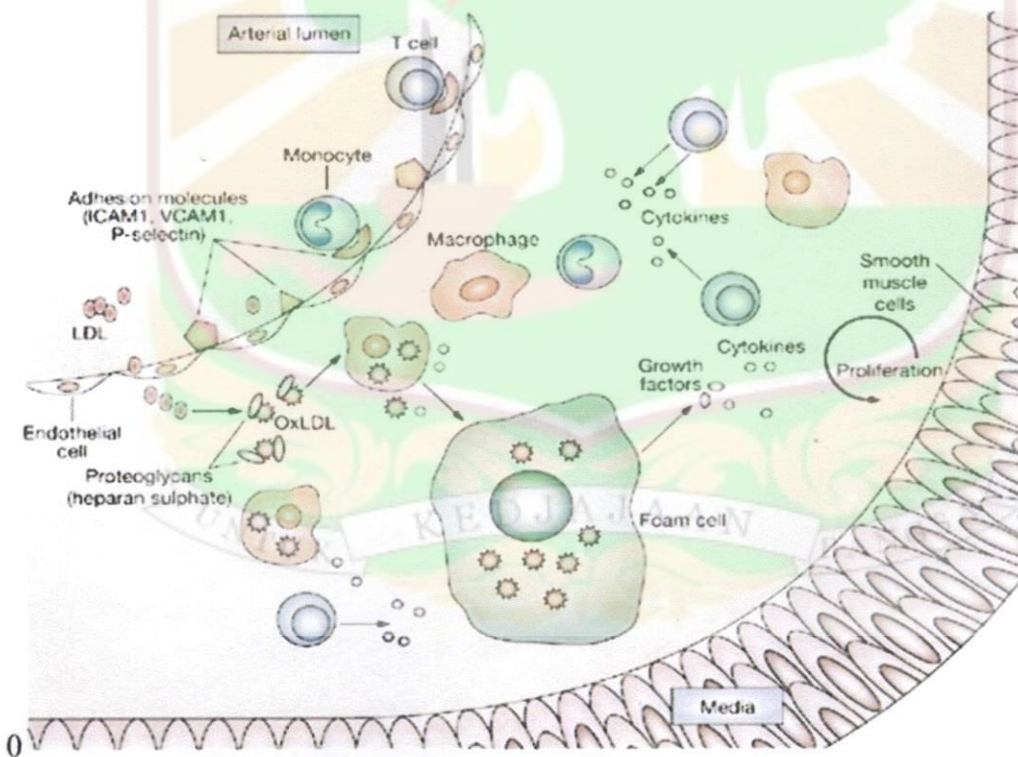
- 1). Gaya hidup yang kurang bergerak
- 2). Stress dan tipe kepribadian
- 3). Obesitas

Bila ditemukan dua faktor atau lebih faktor resiko mayor, maka resiko terjadi aterosklerosis akan berlipat ganda. Aterosklerosis paling dini dapat terlihat pada anak-anak dan cenderung bertambah dengan meningkatnya usia. Biasanya aterosklerosis menimbulkan keluhan atau serangan pada usia diatas 40 tahun. Penyakit ini dapat dicegah karena prosesnya terjadi secara pelan-pelan. Pemantauan secara dini sangat diperlukan untuk pengobatan. (Grundy *et al.*, 2004; Robert, 2008).



### 2.1.2 Patogenesis Pembentukan Ateroma

Hiperkolesterol dapat menyebabkan molekul low density lipoprotein (LDL) mudah teroksidasi, sehingga terbentuk gugus hidroksil pada sel endotel dan otot polos pembuluh darah. Radikal hidroksil ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (polyunsaturated Fatty Acid) yang merupakan struktur dari membran sel termasuk sel endotel sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang akan menghasilkan lipid peroksid. LDL teroksidasi dan lipid peroksid yang terbentuk akan merusak sel endotelium pembuluh darah dan lapisan otot polos di bawahnya (Weinberg, 2004; Cance, 2006; Robert, 2008 ).



Gambar 2.1. Pembentukan aterosklerosis (Sherer 2006).

Didalam intima LDL yang telah menyusup akan mengalami oksidasi tahap pertama sehingga terbentuk LDL yang teroksidasi. LDL-teroksidasi akan memicu

terbentuknya molekul vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1). zat yang dapat melekatkan dan menarik monosit (salah satu jenis sel darah putih) dan menembus lapisan endotel dan masuk ke dalam intima (Mc. Cance, 2006; Yamamoto *et al.*, 2008; Robert, 2008; Rohatgi *et al.*, 2009) seperti terlihat pada Gambar 2.1.

Disamping itu LDL-teroksidasi akan difagosit oleh makrofag (monosit yang telah masuk ke dalam intima), dan membentuk sel busa. Semakin banyak LDL-teroksidasi semakin banyak difagosit oleh makrofag dan makrofag ini menjadi sel busa. Sel busa yang terbentuk akan saling berikatan membentuk gumpalan yang makin lama makin besar sehingga membentuk benjolan yang mengakibatkan penyempitan lumen pembuluh darah. Keadaan ini akan semakin memburuk karena makrofag akan membebaskan faktor pertumbuhan dan akan merangsang sel-sel otot polos pembuluh darah dalam (media) dan kemudian akan berproliferasi sehingga jumlahnya semakin banyak seperti terlihat pada Gambar 2.6 (Hackam, 2006; Xi *et al.*, 2007; Robert, 2008; Yamamoto *et al.*, 2008; Rohatgi *et al.*, 2009).

Makrofag juga mengsekresikan enzim dan sitokin (misalnya IL-1 dan TNF), Gangguan fungsi lapisan endotel pembuluh darah ini menjadi awal proses aterosklerosis dan mendorong mekanisme inflamasi serta infeksi. Menurut Studi Framingham (Robert, 2008), demikian Dede, C-reactive protein (CRP) merupakan pertanda (marker) inflamasi yang berhubungan dengan kejadian penyakit kardiovaskular. Dengan menekan faktor inflamasi ini dapat mencegah terjadi proses aterosklerosis (Jialal, 2006; Haghjooyjavanmarda, 2008).



Hipotesis pertama menyatakan bahwa kadar kolesterol serum dan trigliserida yang tinggi dapat menyebabkan pembentukan arteriosklerosis. Pada orang pengidap arteriosklerosis, pengendapan lemak ditemukan di seluruh lapisan tunika intima, dan meluas ke tunika media. Oksidasi kolesterol dan trigliserid menyebabkan pembentukan radikal bebas yang diketahui merusak sel-sel endotel (Lawrence, 2004 ; Reiterer, 2004; Xi *et al*, 2007).

Hipotesis kedua terbentuknya arteriosklerosis adalah pada keadaan tekanan darah tinggi secara kronis menimbulkan gaya regang atau daya dorong dan merobek lapisan endotel arteri dan arteriol. Gaya regang terutama timbul di tempat tempat arteri bercabang atau membelok, khususnya pada arteri koroner, aorta, dan arteri arteri serebrum. Dengan robeknya lapisan endotel, timbul kerusakan berulang sehingga terjadi siklus peradangan, penimbunan sel darah putih dan trombosit, serta pembentukan bekuan darah. Trombus yang terbentuk dapat terlepas dari arteri ini dan menjadi embolus di organ bagian hilir (Porth, 2007 ).

## **2. 2 Lipid**

Lipid adalah suatu kelompok besar senyawa biologis yang dapat larut dengan baik dalam pelarut organik. Lipid dibedakan atas dua yaitu lipid yang dapat terhidrolisis dan lipid yang tidak terhidrolisis. Lipid yang dapat terhidrolisis tergolong atas ester sederhana dan ester kompleks. Yang tergolong ester sederhana seperti lemak, lilin dan ester sterol. Sedangkan yang tergolong atas ester kompleks seperti fosfolipid, glikolipid, serebrosida serta gangliosida (Koolman & Röhm, 2000).

Komponen lipid yang dapat terhidrolisis berikatan satu dengan yang lainnya melalui ikatan ester. Ikatan ini dapat dipecah secara enzimatik maupun secara kimia. Lipid yang tidak dapat terhidrolisis tergolong atas beberapa senyawa hidrokarbon seperti alkana dan karotenoid, serta tergolong atas lipid alkohol seperti alkanol (sterol) dan steroid (Koolman & Röhm, 2000; Porth, 2007).

## 2.2.1 Klasifikasi Lipid

Berdasarkan sifat fisika dan kimianya, lipid dapat dibagi atas tiga bagian, (Murray, 1997; Brown and Goldstein, 2005; Syarif, 2007; Goodman and Gilman, 2008).

2.2.1.1 Lipid sederhana, yaitu bentuk ester dari asam lemak dengan alkohol, terdiri dari lipid (fat), minyak (oil) dan lilin (wax).

2.2.1.2 Lipid majemuk, yaitu ester asam lemak yang mengandung gugus tambahan selain alkohol dan asam lemak, terdiri dari fosfolipid, glikolipid dan lipid campuran lain (sulfolipid, aminolipid dan lipoprotein).

2.2.1.3 Derivat lipid, yaitu suatu zat yang berasal dari hidrolisis lipid sederhana dan lipid majemuk, yang meliputi asam lemak, gliserol, aldehid, alkohol, dan benda-benda keton.

## 2.2.2 Lemak

Lemak adalah turunan karboksilat dari ester gliserol yang disebut gliserida. Sebagian besar gliserida berupa trigliserida atau triasilgliserol yang ketiga gugus OH dari gliserol diesterkan oleh asam lemak. Lemak tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut nonpolar seperti eter, kloroform, benzene dan aseton. Lemak merupakan komponen makanan yang penting karena nilai gizinya sangat tinggi, sebagai komponen membran sel, bahan metabolik, pelindung dinding sel dan



dapat melarutkan vitamin-vitamin yang tidak larut dalam air. Lipid juga merupakan isolator yang baik yang berfungsi mengisolasi suhu pada mamalia dengan keberadaannya pada jaringan subkutan dan menyelimuti berbagai organ (Brown and Goldstein, 2005; Syarif, 2007)

Di dalam tubuh, lemak disimpan dalam jaringan adiposa dan dimetabolisme dihati. Lemak ini berfungsi sebagai sumber energi. Di dalam jaringan adiposa lemak terdiri dari sekitar 93% trigliserida, 6% fosfolipid dan sejumlah kecil glikolipid dan kolesterol

Lemak dalam makanan (lemak eksogen) mempunyai beberapa fungsi yaitu :

2.2.2.1 Sebagai sumber energi penting pada makanan, lemak dalam makanan

dapat memberikan sekitar 30-35% energi tambahan bagi manusia.

2.2.2.2 Untuk transportasi beberapa vitamin yang larut dalam lemak (Vitamin A, D, E, K).

2.2.2.3 Sebagai sumber asam lemak tak jenuh yang esensial (asam linoleat, asam linolenat, dan asam arakidonat)

Lemak dalam tubuh berfungsi :

- a). Sebagai cadangan energi.
- b). Digunakan sebagai sumber atom karbon untuk berbagai sintesis yang terjadi dalam tubuh.
- c). Sebagai isolator termal dan elektrik.

Untuk menjalankan fungsi isolasi termal pada mamalia, lipid berada pada jaringan subkutan dan menyelimuti berbagai organ serta berfungsi mengisolasi sel dan memungkinkan pembentuk potensial membran elektrik khususnya pada neuron dan sel otot.

- d). Sebagai bantalan mekanik, misalnya di bawah jaringan kulit dan mengelilingi sekitar organ-organ dalam.

### 2.2.3 Asam Lemak

Asam lemak adalah asam organik berantai panjang yang mempunyai atom C 4 sampai 24. Asam lemak merupakan suatu senyawa yang terdiri dari rantai panjang hidrokarbon dan gugus karboksilat yang terikat pada ujungnya yang menyebabkan lipid bersifat tidak larut air dan tampak berminyak atau berlemak. Asam lemak di dalam sel atau jaringan berbentuk tunggal, tidak terdapat secara bebas atau tapi terdapat dalam bentuk yang terikat secara kovalen pada berbagai lipid yang berbeda (Katzung, 2007; Syarif, 2007; Brown and Goldstein, 2006).

#### 2.2.3.1 Fungsi penting asam lemak yaitu:

- a). Sebagai pembentuk fosfolipid dan glikolipid yang merupakan molekul amfipatik sebagai membran biologi.
- b). Sebagai sumber energi.

Untuk bisa digunakan oleh tubuh, maka lemak dari jaringan adiposa harus ditranspor dulu ke jaringan lain dalam bentuk asam lemak bebas. Asam lemak dalam jaringan diperoleh dari hasil hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Di dalam darah asam lemak akan berikatan dengan protein plasma (Katzung, 2007).

#### 2.2.3.2 Berdasarkan ada tidaknya ikatan ganda dalam struktur kimia asam lemak

di alam dapat dibagi menjadi asam lemak jenuh dan tak jenuh.

##### a). Asam lemak jenuh

Asam lemak jenuh tidak mengandung ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak ini berbentuk padat pada suhu kamar



terdapat dalam lemak hewan, seperti lemak daging sapi, daging babi, daging ayam, susu dan keju. Tapi tidak semua lemak hewani mengandung asam lemak jenuh, seperti minyak ikan yang pada temperatur kamar berbentuk cair lebih banyak mengandung asam lemak tak jenuh. Asam lemak jenuh juga terdapat dalam jumlah besar pada minyak nabati seperti minyak kelapa, minyak sawit, lemak kakao dan juga dalam margarin. Asam lemak jenuh dapat meningkatkan kadar kolesterol LDL dalam darah, karena asam lemak jenuh menekan reseptor LDL sehingga mengganggu pengangkutan LDL dalam sirkulasi.

b). Asam lemak tak jenuh

Asam lemak ini bersifat cair pada suhu kamar. Atom H pada ikatan rangkap asam lemak tidak jenuh di alam hampir semuanya berada dalam konfigurasi cis.

Asam lemak tak jenuh ada 2 macam :

- 1) Asam lemak tak jenuh tunggal, mempunyai satu ikatan rangkap sehingga tidak menyebabkan kenaikan atau penurunan kadar kolesterol dalam darah, disebut minyak netral.
- 2) Asam lemak tak jenuh majemuk. Asam lemak ini mempunyai dua atau lebih ikatan rangkap, banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan dan dapat menurunkan kadar kolesterol.

### 2.3 Lipoprotein

Lipoprotein adalah komponen-komponen lemak dalam darah yang terdiri dari trigliserida (triacylglycerol), kolesterol (ester dan bebas), lapisan tunggal fosfolipid, apoprotein (Apo B-100) dan asam lemak bebas tidak larut dalam air.

2.3.1 Fungsi Lipoprotein

Fungsi utama lipoprotein adalah mengangkut komponen-komponen lipid dalam darah yang selanjutnya akan didistribusikan pada jaringan otot dan jaringan lain. Berdasarkan densitas dan pergerakannya pada elektroforesa, lipoprotein dapat dibagi atas (Brown and Goldstein, 2005; Guyton, 2006; Kumar, 2007; Robert, 2008) :

2.3.2 Klasifikasi dan komposisi lipoprotein plasma

Klasifikasi lipoprotein dapat dilihat pada tabel 2. 1

Tabel 2.1. Jenis dan komposisi lipoprotein plasma (Robert, 2008 ).

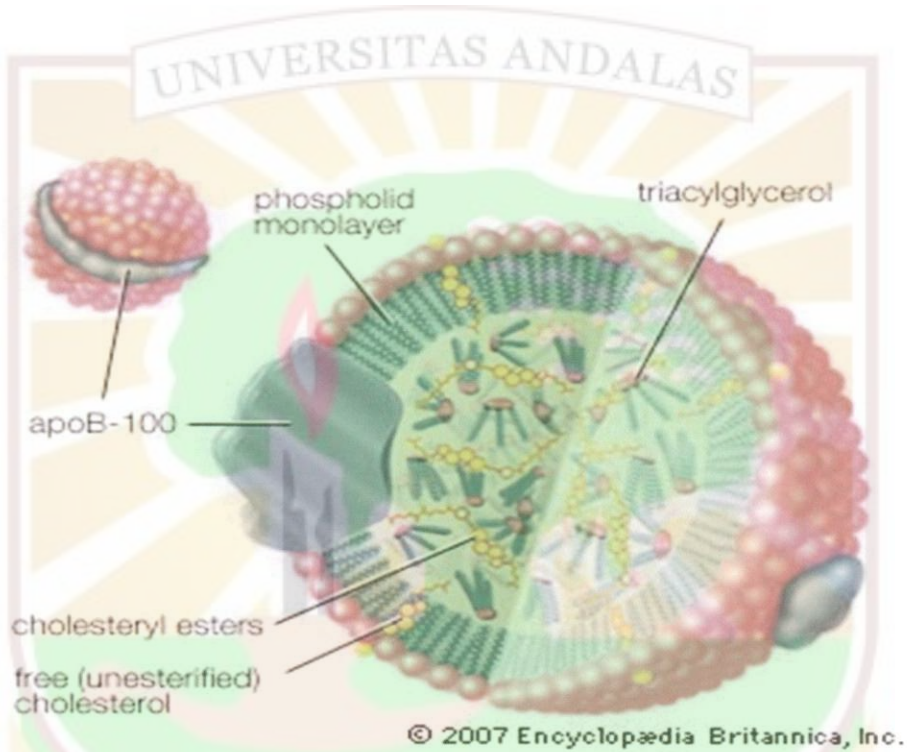
Jenis Lipoprotein	Densitas	Mobilisasi pada Elektroforesa	Lipid utama	Apolipoprotein
Kilomikron	< 0,94	Tidak bergerak	Trigliserida eksogen	APO C, E, B
VLDL	0,95 – 1,006	Prebeta	Trigliserida endogen	APO C, E, B
LDL	1,006 – 1,063	Beta	Kolesterol	APO B
HDL	1,063 – 1,21	Alpha	Kolesterol ester	APO A-1,A-2,C, E

2.3.1.1 Kilomikron

Merupakan lipoprotein yang dibentuk di sel-sel mukosa usus merupakan hasil pencernaan lemak dengan kandungan lemak yang banyak dan protein relatif sedikit. Kilomikron mempunyai bobot molekul yang besar dengankandungan trigliserida 90% dan kurang 5% kolesterol. Kilomikron adalah bentuk lipoprotein yang mengandung trigliserida dan kolesterol yang berasal dari makanan dari saluran cerna diangkut ke otot rangka dan ke jaringan lemak dan hati. Dalam keadaan normal kadar trigliserida meningkat sesudah makan yang disebut kilomikron postprandial. Trigliserida dalam kilomikron dihidrolisa oleh



Supaya lemak dapat diangkut dalam sirkulasi perlu dimodifikasi yaitu berikatan dengan protein plasma membentuk lipoprotein yang larut dalam air seperti pada Gambar 2.2. Gugus protein dalam lipoprotein tersebut disebut apolipoprotein atau apoprotein. Apoprotein berfungsi untuk mempertahankan struktur lipoprotein dan berperan dalam metabolisme lemak tersebut (Guyton, 2006; Porth, 2007; Robert, 2008 ).



Gambar 2.2. Struktur Lipoprotein ( Encyclopædia Britannica, Inc)

Lipoprotein yang mengandung sedikit lemak dan banyak protein adalah yang lebih tinggi densitasnya dan yang mengandung banyak lemak dan sedikit protein adalah yang lebih rendah densitasnya. Jadi perbandingan antara lipid dengan protein pada lipoprotein menentukan densitasnya. Lemak murni mempunyai densitas yang lebih rendah dari air. Prinsip ini digunakan untuk memisahkan lipoprotein dari plasma dengan ultrasentrifus (Guyton, 2006; Porth, 2007; Robert, 2008).

lipoprotein lipase yang diproduksi oleh sel endotel dalam vaskuler. Kilomikron mempunyai waktu paruh 5-15 menit.

#### 2.3.1.2 Pre- $\beta$ lipoprotein (Very Low Density Lipoprotein-VLDL).

Very Low Density Lipoprotein (VLDL) dibentuk dari prekursornya asam lemak bebas di sel hati dan merupakan lipoprotein nomor dua terbesar dengan kandungan protein paling kecil. Terdiri dari 60% trigliserida dan 10-15 % kolesterol. VLDL adalah bentuk lipoprotein yang diangkut dari hati ke jaringan. Pemecahan VLDL terjadi di intravaskular oleh lipoprotein lipase menjadi Intermediate density lipoprotein (IDL). IDL dan HDL dengan aktivitas enzim Lecitin Cholesterol Acyl Transferase (LCAT) akan membentuk LDL. Asam lemak bebas dan gliserol dapat disintesa dari karbohidrat, maka makanan yang kaya karbohidrat akan meningkatkan VLDL. Sintesa VLDL di hati berasal dari trigliserida, kolesterol, dan fosfolipid. Waktu paruh VLDL adalah 6-12 hari.

#### 2.3.1.3 $\beta$ -lipoprotein (Low Density Lipoprotein-LDL)

Low Density Lipoprotein (LDL) sebagian besar berasal dari kilomikron dan VLDL, sebagian lagi disekresi oleh hati. LDL terdiri dari hampir 75% kolesterol dan kurang dari 10 % trigliserida. Kolesterol dari hati dibawa ke perifer dalam bentuk LDL. LDL akan terikat pada reseptor spesifik yaitu reseptor LDL yang berperan sebagai homeostatis yaitu mengatur kolesterol yang beredar dalam sirkulasi darah. Reseptor LDL banyak terdapat di sel hati, sel kelenjar gonad, dan sel kelenjar adrenal. Bila reseptor terganggu, maka kadar LDL akan meningkat dalam sirkulasi darah. Kolesterol yang berlebihan jika menempel pada pembuluh darah koroner dapat menyebabkan penyakit jantung koroner.



Kadar LDL dalam plasma dipengaruhi oleh pemasukan lemak bersamaan makanan. Bila lemak tak jenuh berantai panjang banyak masuk akan terjadi penurunan kadar LDL darah. Kadar LDL ini penting diketahui, dimana peningkatan kadar LDL berhubungan dengan insiden jantung koroner. Waktu paruh LDL 3-4 hari.

#### 2.3.1.4 $\alpha$ -lipoprotein (High Density Lipoprotein-HDL)

High Density Lipoprotein merupakan lipoprotein dengan kandungan protein paling tinggi. Komponen HDL adalah 20% kolesterol, 5% trigliserida, dan 50% protein. Kolesterol dari jaringan dan dinding pembuluh darah dibawa dalam bentuk HDL dan kemudian dikembalikan ke hati dan dibuang ke dalam empedu, selanjutnya diekstensikan melalui feses.

### 2.3.3 Transportasi Lipid dalam Tubuh

Lipid plasma yang utama adalah kolesterol, trigliserida, fosfolipid dan asam lemak bebas dan tidak larut dalam cairan plasma. Agar lipid plasma dapat diangkut dalam sirkulasi, maka susunan molekul lipid tersebut perlu dimodifikasi, yaitu dalam bentuk lipoprotein sehingga dapat larut dalam air (Guyton, 2006; Price 2006; Robert, 2008).

Ada tiga cara lipid masuk kedalam darah seperti terlihat pada gambar 2.3

#### 2.3.3.1 Jalur eksogen

Trigliserida dan kolesterol yang berasal dari makanan sebelum diserap oleh usus, harus terlebih dahulu di emulsikan dengan bantuan garam-garam empedu. Garam-garam empedu ini disintesis di hati dan disekresikan dari kantung empedu ke usus halus. Emulsifikasi ini dibantu oleh enzim lipase yang dihasilkan organ pankreas (lipase dan fosfolipase  $A_2$ ) dan akan menghasilkan asam lemak

bebas dan campuran mono dan digliserida dari trigliserida. Setelah diabsorpsi oleh sel-sel mukosa saluran cerna, pembentukan trigliserida terjadi kembali. sebagai cadangan atau dioksidasi untuk menghasilkan energy (Lees, 2005; Price 2006; Robert, 2008)..

Seperti dalam Gambar 2.3. trigliserida ini bersama protein, fosfolipid dan kolesterol ester bergabung membentuk kilomikron. Kilomikron dalam lapisan mukosa saluran cerna kemudian dilepaskan ke dalam sirkulasi darah melalui saluran limfa untuk diantarkan ke jaringan lain untuk disimpan atau dirobah jadi energi. Di dalam pembuluh darah, trigliserida dalam kilomikron mengalami hidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase yang terdapat pada permukaan sel endotel.

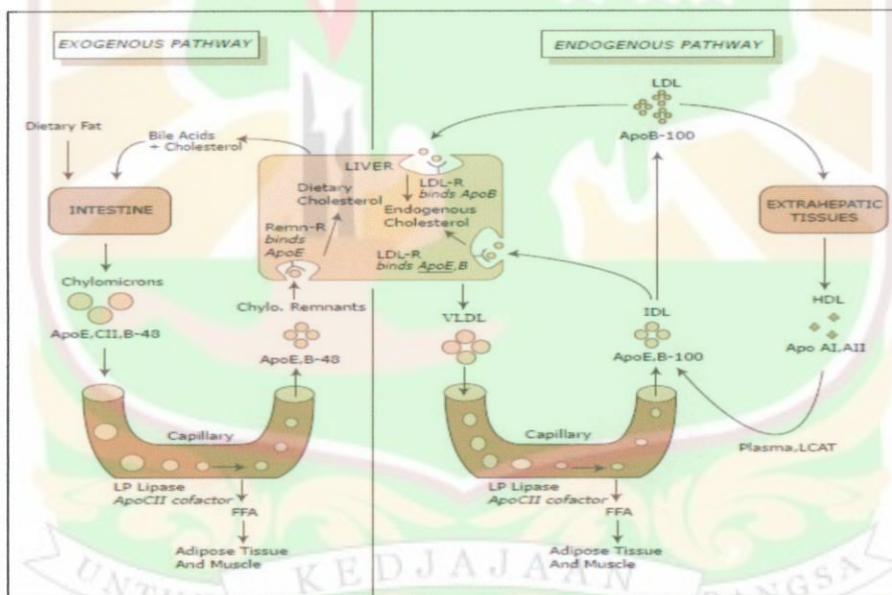


Figure by MIT OCW.

Gambar 2.3. Jalur Transportasi Lipoprotein Eksogen (Lees 2005)

Hasil hidrolisis ini akan membentuk asam lemak dan gliserol serta kilomikron sisa (remnant). Asam lemak bebas akan menembus lapisan endotel dan masuk ke dalam jaringan adipose atau sel otot untuk diubah menjadi trigliserida kembali



Kilomikron sisa adalah kilomikron yang telah dihidrolisa sebagian besar trigliseridanya sehingga ukurannya jadi kecil tapi jumlah ester kolesterolnya tetap. Kilomikron sisa ini akan dibersihkan oleh hati dari sirkulasi dengan mekanisme endositosis. Hasil metabolisme ini berupa kolesterol bebas, kolesterol ini yang akan digunakan untuk sintesis berbagai struktur (membran plasma, mielin, hormon steroid), disimpan dalam hati sebagai kolesterol ester lagi atau dieksresikan ke dalam empedu (sebagai kolesterol atau asam empedu) atau diubah menjadi lipoprotein endogen yang dikeluarkan ke dalam plasma berupa VLDL (Very Low Density Lipoprotein).

#### 2.3.3.2 Jalur endogen

Trigliserida dan kolesterol yang disintesis di hati akan dieksresikan ke dalam sirkulasi sebagai lipoprotein VLDL. Apolipoprotein yang terkandung dalam VLDL adalah apolipoprotein B 100. Dalam sirkulasi, trigliserida kandungan VLDL akan mengalami hidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase (LPL), dan VLDL berubah menjadi IDL yang juga akan mengalami hidrolisis dan berubah menjadi LDL. Sebagian dari VLDL, IDL dan LDL akan mengangkut kolesterol ester kembali ke hati. LDL adalah lipoprotein yang paling banyak mengandung kolesterol. Sebagian dari kolesterol pada LDL akan dibawa ke hati dan jaringan steroidogenik lainnya seperti kelenjar adrenal, testis, dan ovarium yang mempunyai reseptor untuk LDL.

Sebagian lagi dari kolesterol-LDL akan mengalami oksidasi dan ditangkap oleh reseptor scavenger-A (RS-A) di makrofag dan akan menjadi sel busa (foam cell). Makin banyak kadar kolesterol-LDL dalam plasma makin banyak yang akan

mengalami oksidasi dan ditangkap oleh sel makrofag. Jumlah kolesterol yang akan teroksidasi tergantung dari kadar kolesterol yang terkandung di LDL.

#### 2.3.3.3 Jalur Reverse Cholesterol Transport

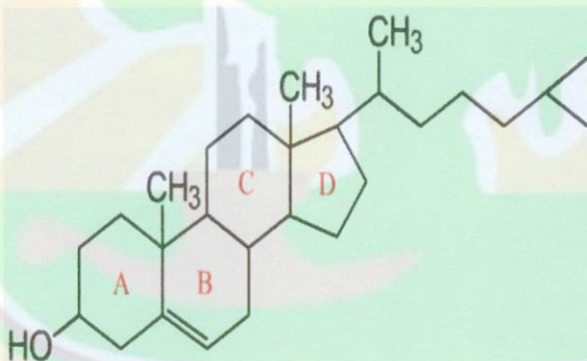
High Density Lipoprotein (HDL) dilepaskan sebagai partikel kecil sedikit kolesterol yang mengandung apolipoprotein (apo) A, C dan E; dan disebut HDL nascent. HDL nascent berasal dari usus halus dan hati, mempunyai bentuk gepeng dan mengandung apolipoprotein A1. HDL nascent akan mendekati makrofag untuk mengambil kolesterol yang tersimpan di makrofag. Setelah mengambil kolesterol dari makrofag, HDL nascent, kolesterol (kolesterol bebas) di bagian dalam dari makrofag dibawa ke permukaan membrane sel makrofag oleh suatu transporter yang disebut adenosine triphosphate-binding cassette transporter-1 atau disingkat ABC-1 (Lees, 2005; Price 2006; Robert, 2008)..

Setelah mengambil kolesterol bebas dari makrofag, kolesterol bebas akan diesterifikasi menjadi kolesterol ester oleh enzim lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). Selanjutnya sebagian kolesterol ester yang diambil oleh HDL akan mengalami dua jalur. Jalur pertama ialah ke hati dan ditangkap oleh scavenger receptor class B type 1 dikenal dengan SR-B1. Jalur kedua adalah kolesterol ester dalam HDL akan ditukar dengan trigliserid dari VLDL dan IDL dengan bantuan cholesterol ester transferase protein (CETP). Dengan demikian fungsi HDL sebagai “penyerap” kolesterol dari makrofag ada dua jalur yaitu langsung ke hati dan jalur tidak langsung melalui VLDL dan IDL untuk membawa kolesterol kembali ke hati (seperti terlihat pada gambar.2.3).



## 2.4 Kolesterol

Kolesterol merupakan zat lemak yang bewarna kekuningan yang memiliki inti steroid. Kolesterol merupakan bahan yang esensial bagi tubuh sebagai prekursor pada sintesa membran sel, hormon kelamin dan hormon anak ginjal, vitamin D serta asam empedu. Seperti terlihat pada gambar 2.4 nama kimia kolestrerol adalah  $\Delta^5$ -kolestan- $3\beta$ -ol,  $\Delta^5$  menunjukkan adanya ikatan rangkap pada atom C nomor 5 dan 6,  $3\beta$ -ol merupakan petunjuk bagi gugus hidroksi pada atom karbon nomor 3. Kolesterol terdapat dalam jaringan dan plasma mengangkut kolesterol bebas dalam darah (Koolman&Röhm, 2000).



Gambar 2.4. Struktur umum kolesterol (Koolman&Röhm, 2000).

Kolesterol ester merupakan bentuk simpanan kolesterol yang ditemukan dalam sebagian besar jaringan tubuh. Kolesterol bebas dikeluarkan dari jaringan dalam bentuk HDL dan kemudian diangkut ke dalam hati dan diubah menjadi asam empedu. LDL merupakan sumber kolesterol dan ester kolesterol di jaringan tubuh (Katzung 2007; 2007; Robert, 2008).

Kebutuhan kolesterol sehari adalah 1 gram, dan ini dapat dipenuhi oleh tubuh dengan sintesis sendiri di dalam tubuh. Lebih kurang setengah kolesterol

berasal dari biosintesis dalam tubuh yang terjadi pada usus, korteks adrenal, kulit, aorta, testis dan terutama dalam hati ( $\pm 50\%$ ). Kolesterol tambahan diperoleh dari bahan makanan (Deviana, 2010). Kolesterol merupakan hasil metabolisme hewan oleh sebab itu banyak terdapat dalam makanan yang berasal dari hewan seperti telur, daging, hati dan otak. Pada dasarnya semua sel-sel berinti mampu mensintesis kolesterol. Fraksi mikrosomal pada retikulum endoplasma dan sitosol sel bertanggung jawab pada sintesis kolesterol. Sumber semua atom C dalam kolesterol adalah berasal dari Asetil-koA. Kolesterol akan dikeluarkan dari tubuh melalui empedu sebagai asam-asam empedu yang dikeluarkan melalui feses. Kolesterol merupakan prazat semua senyawa steroid dalam tubuh seperti kortikostreoid, steroid, hormon kelamin, asam empedu dan vitamin D (Guyton and Hall, 2006).

Beberapa fungsi kolesterol tubuh antara lain.

- 2.4.1 Sebagai bahan dasar pembentukan hormon kelamin dalam tubuh, yang sangat penting untuk perkembangan dan fungsi organ seksual.
- 2.4.2 Sebagai bahan dasar hormone korteks adrenal, yang sangat penting bagi metabolisme dan keseimbangan elektrolit dalam tubuh.
- 2.4.3 Pembentukan asam empedu, yang sangat penting bagi pencernaan lemak.
- 2.4.4 Pembentukan vitamin D, yang sangat penting untuk membantu tubuh menyerap kalsium.
- 2.4.5 Pembentukan struktur membran sel, yang mengatur penyerapan zat yang tidak larut dalam air dan penguapan dikulit.



## 2.5 Endotel

Endotel adalah lapisan sel yang melapisi dinding vaskular yang menghadap ke lumen dan melekat pada jaringan subendotel yang terdiri atas kolagen dan berbagai glikosaminoglikan termasuk fibronektin. Sel endotel berasal dari mesoderm yang membatasi dinding pembuluh darah dan dinding pembuluh limfa (Deanfield *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2009). Endotel terletak di antara sirkulasi darah dan dinding pembuluh darah. Pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg, endotel meliputi area seluas 700 m<sup>2</sup> dengan berat 11,5 kg. Dianggap bahwa fungsi endotel adalah hanya sebagai barier struktural antara sirkulasi dengan jaringan di sekitarnya (Luscher and Barton 1997). Sekarang endotel dianggap sebagai organ vasoaktif dan telah banyak dibicarakan oleh berbagai ahli sehingga endotel makin dikenal peranannya tidak hanya dalam mensekresi substansi yang mengatur struktur dan tonus pembuluh darah juga beberapa fungsi lain seperti pengaturan hemodinamik, metabolisme, inflamasi dan proses trombogenik (Deanfield *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2009).

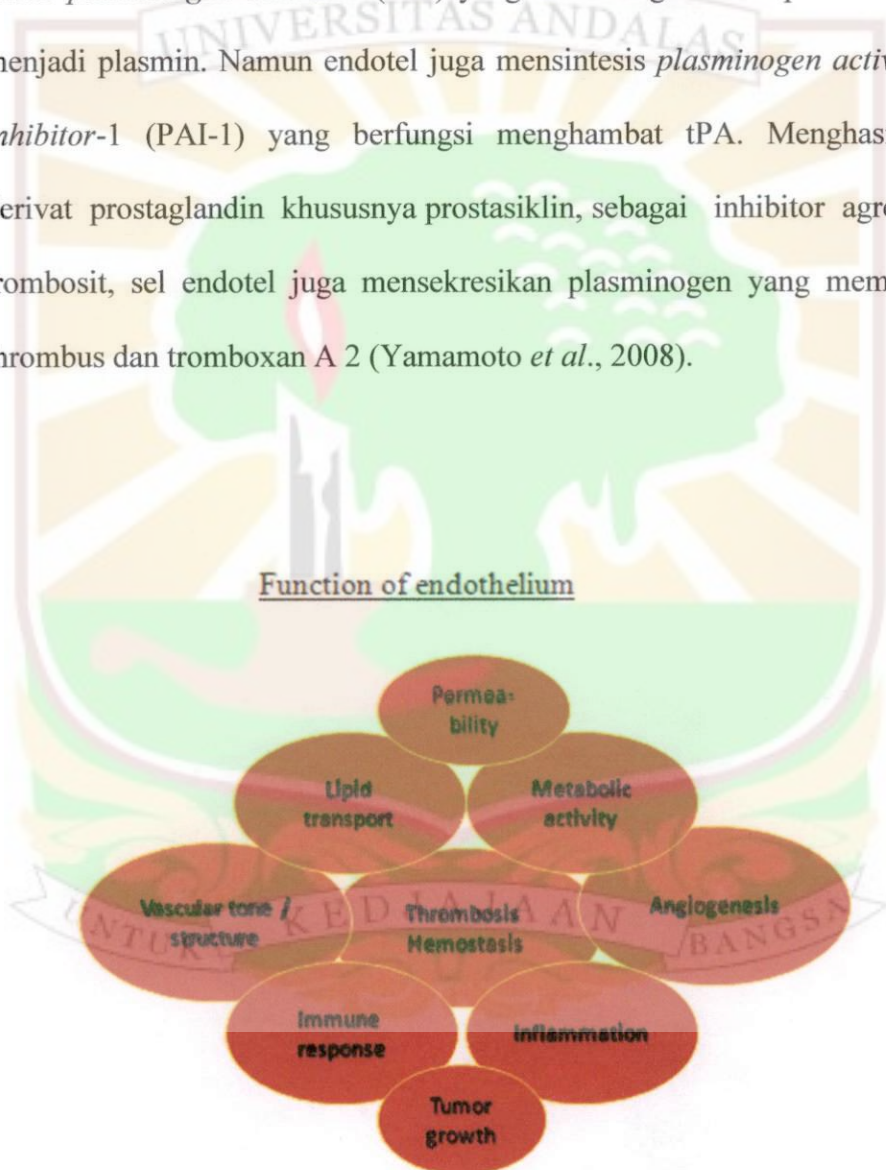
### 2.5.1 Fungsi Endotelium

Endotel merupakan barier dengan permeabilitas yang sangat selektif yang mengatur aliran bahan makanan, beberapa molekul aktif biologi dan sel darah. Fungsi sel endotel antara lain (Gambar 2.5) :

#### 2.5.1.1 Memelihara keseimbangan antara trombosis and fibrinolisis.

Endotel secara normal memiliki permukaan non-trombogenik melalui ekspresi trombomodulin. Endotel membantu trombin dalam mengaktifkan protein C menjadi protein C aktif. Selain itu endotel juga mensintesis protein S yang bekerja sebagai kofaktor protein C dalam menginaktivasi

faktor Va dan factorVIIIa (Mappahya *et al.*, 2006). Endotel juga mensintesis faktor von Willebrand (vWF) yang berfungsi dalam proses adesi trombosit dan sebagai pembawa faktor VIII. Faktor von Willebrand disimpan di dalam Weibel-Palade bodies (Haghjooyjavanmarda *et al.*, 2008). Endotel juga berperan dalam sistem fibrinolisis melalui pelepasan *tissue plasminogen activator* (tPA) yang akan mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin. Namun endotel juga mensintesis *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) yang berfungsi menghambat tPA. Menghasilkan derivat prostaglandin khususnya prostasiklin, sebagai inhibitor agregasi trombosit, sel endotel juga mensekresikan plasminogen yang memecah thrombus dan tromboxan A<sub>2</sub> (Yamamoto *et al.*, 2008).



J Cardiovasc Pharmacol, Vol 22 (Suppl 4), 1993

Gambar 2.5. Fungsi sel endotel (Allan 1993).



### 2.5.1.2 Menstimulasi pertumbuhan

Menstimulasi pertumbuhan dengan dihasilkannya *Platelet growth-derived factor* (PGDF), *Fibroblast Growth Factor* (IGF-1). Berperan pada proses inflamasi dengan menghasilkan proinflamasi *Adhesion molecules*, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM), *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM) (Ley and Huo, 2007; Rohatgi *et al.*, 2009).

### 2.5.1.3 Berperan aktif dalam respons imun.

Seperti meningkatkan integrin, molekul adhesi dan mensekresikan sitokin, mengizinkan migrasi monosit, limfosit, dan netrofil dan sebagai besar aktivitas fagosit lokal.

### 2.5.1.4 Mengatur tonus vascular.

Melalui pembentukan sejumlah bahan vasoaktif. Substansi vasoaktif yang dikeluarkan endotel yang berefek vasodilator antara lain nitrogen monoksida (NO) yang juga disebut *endothelial-derived relaxing factor* (EDRF), *endothelial-derived hyperpolarizing factor* (EDHF), prostasiklin (prostaglandin  $GI_2$  /  $PGI_2$ ), bradikinin, asetilkolin, serotonin dan histamin (American Heart Association, 2000; Dessy and Ferron, 2004). Substansi vasokonstriktor antara lain endotelin, *platelet activating factor* (PAF) angiotensin II, prostaglandin  $H_2$  (Mawji *et al.*, 2004).

## 2.5.2 Disfungsi Endotel

Disfungsi endotel berperan penting pada patogenesis, perkembangan dan prognosis dari penyakit kardiovaskuler. Faktor risiko terjadi disfungsi sel endotel antara lain: hipertensi, merokok, diabetes, umur, obesitas, dislipidemia, dan *sedentary life style*. Sebagian besar proses sistemik yang menginduksi disfungsi

endotel adalah mengaktifasi intracellular oxidative signaling, selain itu terjadi modulasi oksidasi LDL. Endotel vaskuler merupakan jaringan yang responsif secara metabolik. Apabila terjadi rangsangan berlangsung terus menerus akan mengakibatkan terjadi disfungsi sel endotel (Lawrence, 2004; Xi, 2007).

Disfungsi endotel, mengakibatkan serangkaian fenomena maladaptif yang mengakibatkan terjadinya respons vaskuler yang tidak menguntungkan. Sebagai akibat dari adanya stres oksidatif dan perubahan reaksi redoks lokal, adalah gangguan profibrinolitik, yang menyebabkan terjadi proses trombogenesis (Lawrence, 2004; Simionescu, 2007).

Jika sel endotel mengalami gangguan oleh berbagai hal seperti *shear stress* hemodinamik, stress oksidatif maupun paparan dengan sitokin inflamasi dan hiperkolesterolemia, maka fungsinya sebagai pengatur menjadi abnormal dan disebut disfungsi endotel. Pada keadaan ini khususnya terjadi ketidak seimbangan substansi vasoaktif sehingga dapat terjadi hipertensi dan aterosklerosis (Lawrence, 2004; Reiterer *et al.*, 2004; Simionescu, 2007). Sebagai dampak dari stres oksidatif dan perubahan status reaksi redoks lokal terjadi disfungsi endotel mengakibatkan serangkaian fenomena maladaptif yang mengakibatkan terjadinya respons vaskuler yang tidak menguntungkan., seperti gangguan profibrinolitik, yang mengakibatkan tercetusnya proses thrombogenesis. (Lawrence, 2004; Reiterer *et al.*, 2004; Simionescu, 2007).

Endotel yang mengalami disfungsi pada permukaanya akan mengekspresikan molekul adhesi. seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) (Ley and Huo, 2001) dan *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Yamamoto *et al.*, 2008; Rohatgi, 2009). Disfungsi sel endotel juga



mengakibatkan permukaan non trombogenik berubah menjadi trombogenik, sehingga terjadi aktivasi koagulasi. Sebagai petanda aktivasi koagulasi dapat diperiksa D-dimer, kompleks trombin-antitrombin, fragmen protrombin 1 dan 2 (F1.2) atau fibrin monomer (Furie and Furie, 2005; Constans 2006).

Disfungsi sel endotel sering diartikan menurunnya daya vasodilatasi pembuluh darah, karena terjadi penurunan produksi dan bioaktivitas faktor vasodilatasi lokal, khususnya nitric oxide (NO) atau nama lainnya *Endothelium Derivate Relaxing Factor* (EDRF) (Lawrence, 2004; Kleinbongard 2006; Ghasemi *et al.*, 2007; Simionescu, 2007), dan juga terganggu fungsi normal endotel yang lain, seperti interaksinya dengan leukosit, platelets dan faktor-faktor pengatur lain. Akhir-akhir ini disfungsi sel endotel diyakini awal perkembangan aterosklerosis (Dessy and Ferron, 2004; Reiterer *et al.*, 2004; Rohatgi *et al.*, 2009).

Telah dipublikasikan sejumlah hasil penelitian bahwa adanya percepatan degradasi NO akibat disfungsi sel endotel oleh *reactive oxidative spesies* (ROS) sehingga terjadi penurunan ketersediaan NO. Kelebihan produksi ROS, seperti anion superoksida dan kolesterol LDL teroksidasi dan penurunan antioksidan yang tersedia tidak cukup untuk melawan ROS sehingga terjadi disfungsi sel endotel (Xi, 2007).

## 2.6 Nitrogen Mono Oksida (NO)

Nitrogen mono oksida (NO) merupakan molekul sederhana yang berperan dalam regulasi sistem kardiovaskular, sistem kekebalan dan sistem saraf. NO berasal dari oksidasi guanidine dari *L-arginine*. NO adalah gas stabil yang sangat mudah berdifusi dan tersusun atas 1 atom nitrogen dan 1 atom oksigen. NO

disintesis oleh kelompok enzim yang secara kolektif disebut *nitric oxide synthase* (NOS) (Silalahi dan Jansen, 2005; Tsikas, 2005)

Nitrogen mono oksida diaktivasi oleh heme dan oleh radikal bebas superoksida. Karena itulah pencari (*scavenger*) anion superoksida seperti *superoxide dismutase* dapat melindungi NO, meningkatkan potensinya dan memperpanjang masa kerjanya. Sebaliknya, interaksi antara NO dengan superoksida dapat menghasilkan gugus perusak jaringan yang kuat, *peroxynitrite* (ONOO-), yang mempunyai afinitas tinggi terhadap gugus *sulphydryl* sehingga dapat menginaktivasi beberapa enzim yang mempunyai gugus *sulphydryl*. Efek dari *peroxynitrite* diregulasi oleh kandungan *gluthatione* seluler. Karena *gluthatione* adalah senyawa intraseluler yang mengandung gugus *sulphydryl* yang sangat mudah larut, maka faktor-faktor yang mengatur biosintesis dan penguraian *gluthatione* dapat menimbulkan dampak yang penting (Lawrence , 2004; Mappahya *et al.*, 2006; Halliwell and Gutteridge, 2007).

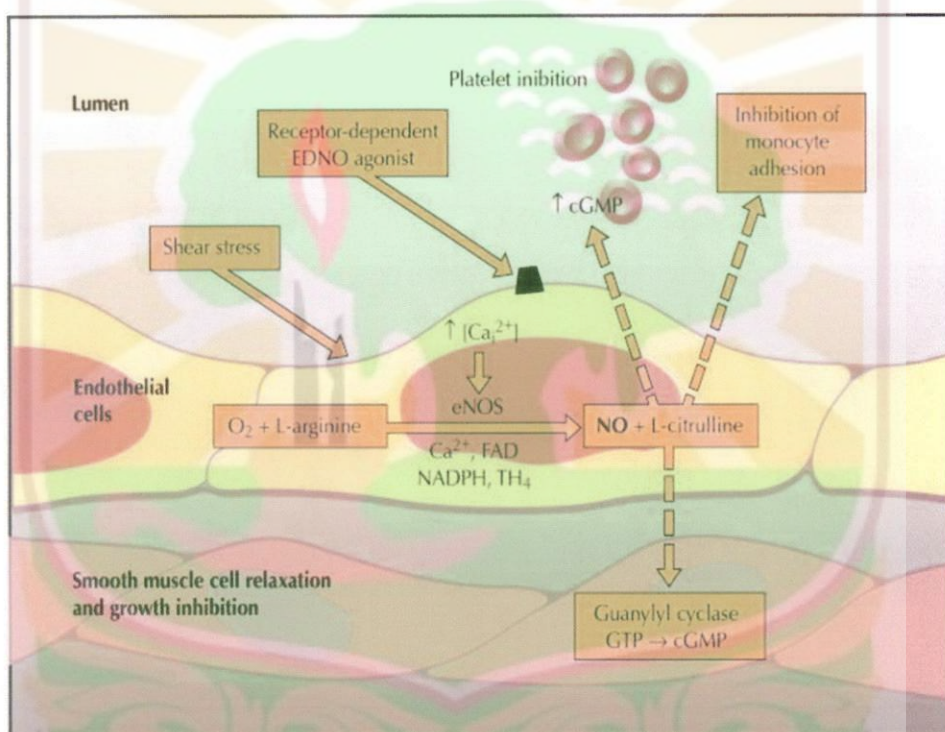
### 2.6.1 Fungsi Biologis Nitrogen Mono Oksida

Selama beberapa dekade telah terbukti, bahwa NO tidak hanya berperan dalam mengontrol tonus vasomotor melainkan juga berperan dalam homeostasis pembuluh darah dan syaraf serta proses imunologis. NO endogen diproduksi melalui perubahan asam amino L-arginine menjadi L-citrulline oleh enzim NO-synthase (NOS). Beberapa isoform dari NOS telah berhasil dimurnikan dan dikloning sebagai NOS-type I (yang diisolasi dari otak dikenal neuronal NOS-type I) dan NOS-type III (yang diisolasi dari sel endotel dikenal endothelial NOS-type III) yang disebut juga constitutive-NOS (cNOS). Kedua isoform ini aktivitasnya diatur oleh  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulin dan NADPH, flavin adenine



dinucleotide/mononucleoti (FAD/FMN), dan tetrahydrobiopterin (HB4) sebagai kofaktor (Dessy and Ferron, 2004; Ghasemi *et al.*, 2007).

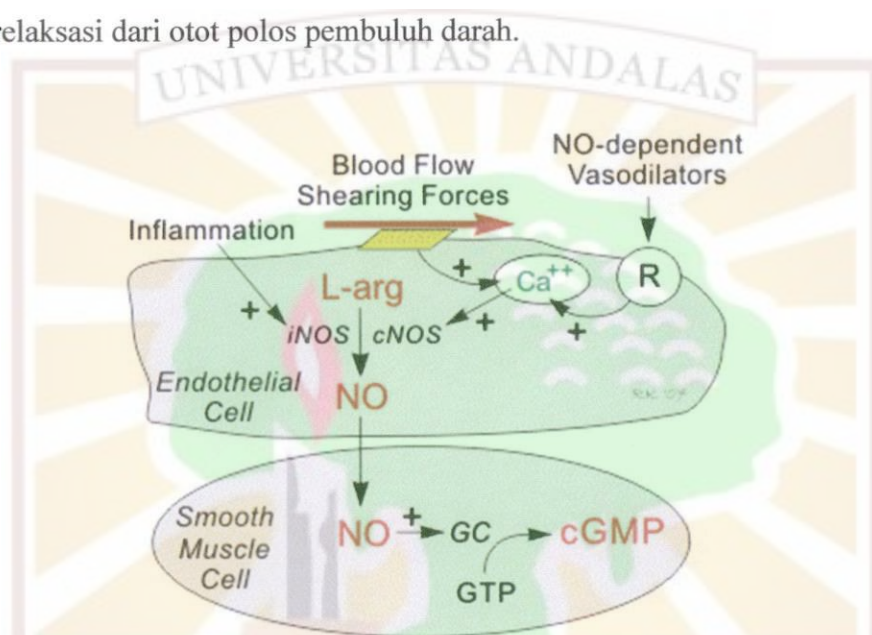
Neuronal-NOS type I berperan penting dalam proses transmisi syaraf, mengontrol homeostasis pembuluh darah dan dalam proses pembelajaran dan memori. Didalam sistem syaraf perifer, NOS berhubungan dengan impuls syaraf nonadrenergik (NA), noncholinergik (NC).



Gambar 2.6 Ilustrasi peranan NO ( EDRF ) (medicalmyths.wordpress.com).

Seperti terpapar pada Gambar 2.6 Endothelial-NOS (eNOS type III) berperan penting dalam mengontrol tonus pembuluh darah sebagai respons terhadap berbagai rangsangan, seperti rangsangan mekanik (*shear stress*), rangsangan pada reseptor dependen dan reseptor independen asetilkolin (*calcium ionophore*).

Nitrogen mono oksida yang dihasilkan oleh NOS type III didalam endotel akan berdiffusi kedalam sel otot polos pembuluh darah yang akan mengaktifkan enzim *guanylate cyclase*. Bersamaan dengan peningkatan cyclic GMP, yang menyebabkan fosforilasi rantai miosin rantai fosfatase (karena inaktivasi) rantai miosin kinase dan terakhir menunjukan defosforilasi rantai miosin, menyebabkan terjadi relaksasi dari otot polos pembuluh darah.



Gambar 2.7. Ilustrasi peranan NO ( EDRF ) (Klabunde 2011).

Seperti terlihat pada Gambar 2.7 hasil akhir dari peningkatan Nitrat Oksida akan terjadi vasodilatasi (Howard, 2006 ). NOS type III juga berperan dalam pencegahan agregasi platelet yang abnormal. NOS type II dan IV (yang diisolasi dari makrofag) bersifat independen terhadap  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulin dan disebut juga "inducible-NOS", karena aktivasinya hanya terjadi pada saat makrofag menimbulkan efek sitotoksik sebagai respons terhadap sitokin (misal dalam keadaan sepsis) (Hansson, 2005).



### 2.6.3 Pengaruh Nitrogen Mono Oksida terhadap Kehidupan Sel

Aktivitas NO mempengaruhi biologis kehidupan sel, diantaranya adalah pada oksidasi Fe yang terkandung dalam protein seperti pada enzim ribonucleotide reductase dan aconitase, aktivasi guanylate cyclase terlarut, ribosilasi ADP pada protein, gugus *sulfhydryl nitrosylation* protein, dan *Fe regulatory factor activation* NO terlibat mengaktifkan NF- $\kappa$ B sel mononuclear dalam darah perifer, dan penting pada faktor transkripsi ekspresi gen iNOS yang merespon inflamasi. NO bekerja melalui stimulasi *guanylate cyclase* suatu *enzyme heterodimerik* yang akan mengaktifasi pembentukan cyclic GMP. Cyclic GMP mengaktifasi protein kinase G, yg menyebabkan fosforilasi rantai miosin pada gugus enzim fosfatase dan terjadi defosforilasi rantai miosin, yang menyebabkan relaksasi (Shami, 1995; Howard, 2007).

### 2.6.4 Farmakologi Nitrogen Mono Oksida

Nitrogen mono oksida yang dihasilkan dari metabolisme obat antiangina menyebabkan vasodilasi pembuluh darah koroner yang mengalami aterosklerosis dan memperbaiki aliran darah koroner jantung. Tablet nitrogliserin diletakan dibawah lidah, digunakan mencegah atau pengobatan serangan akut pada angina nitrogliserin bereaksi dengan gugus *sulfhydryl* (-SH) menghasilkan NO, dan menghilangkan nyeri dengan memberikan efek vasodilasi sehingga aliran darah jadi lancar (Brunton, 2008).

### 2.7 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)

Vascular cell adhesion protein-1 dikenal juga dengan vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) atau *Cluster of differentiation* 106 (CD106) adalah protein dalam tubuh manusia dikode oleh gen *VCAM-1*. VCAM-1

berfungsi sebagai molekul adesi sel (Barreiro *et al.*, 2002; Rohatgi *et al.*, 2009). VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), dikenal sebagai CD106, dihasilkan oleh gen berperan mengatur sistim immune pada manusia. VCAM-1 adalah immunoglobulin molekul adesi diekspresikan bila sel endotel diaktivasi oleh keadaan proaterosklerotik pada kelinci (3), mencit (4) dan manusia (5) termasuk lesi tahap awal. VCAM-1 terikat pada integrin  $\alpha 4\beta 1$  dan menarik limfosit, monosit, dan eosinophil. VCAM-1 dpt memediasi adesi leukosi secara rolling/berputar dan menetap tergantung keadaan aviditas integrin  $\alpha 4\beta 1$ (2). Pola pengaturan VCAM-1 sangat unik. VCAM-1 tidak diekspresikan pada keadaan normal tapi segera diekspresikan setelah ada induksi.

Oksidasi LDL mengawali dan perkembangan aterosklerosis. Pada endotel reseptor LDL oks, (LOX-1) bertanggung jawab untuk pengikatan, internalisasi dan degradasi LDL oks dalam sel endotel. Percobaan *in vivo* dan *in vitro* memperlihatkan reseptor ini mengawali aterosklerosis dan diatur oleh faktor pro-aterogenik seperti TNF- $\alpha$ , LDL oks dan stres luka. Awal disfungsi sel endotel VCAM-1 adalah marker yang sensitif bahkan lebih baik dari vWF dari s-thrombomodulin dalam aterosklerosis, walaupun diekspresikan pada sel tipe lain, seperti leukosit. (Ordonez *et al.*, 2003).

### 2.7.1 Struktur VCAM-1

Gen VCAM-1 mengandung 6 atau 7 domain imunoglobulin dan diekspresikan dalam jumlah besar atau kecil pada pembuluh darah setelah sel endotel distimulasi oleh sitokin. Dihubungkan menjadi 2 transkripsi RNA dengan kodon isoform yang berbeda dalam manusia. Gen menghasilkan sialoglycoprotein



pada permukaan sel, protein membrane tipe I ini termasuk superfamili Ig (Rohatgi *et al.*, 2009).

### 2.7.2 Fungsi VCAM-1

Vascular Cell Adhesion Molecule-1 adalah protein yang memediasi adesi limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil pada lapisan endotel pembuluh darah, berfungsi dalam perpindahan sinyal sel endotel ke leukosit, dan mungkin berperan dalam perkembangan aterosklerosis dan rheumatoid arthritis.

Pengaturan pembentukan VCAM-1 dalam sel endotel oleh sitokin adalah akibat terjadi peningkatan transkripsi gen (contohnya respon pada tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) dan Interleukin-1 (IL-1) dan melalui stabilisasi Messenger RNA (mRNA) (seperti Interleukin-4 (IL-4)). Daerah promotor gen VCAM-1 mengandung kedua tempat fungsional NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) menguatkan ekspresi VCAM-1 setelah lebih 2 jam.

Protein VCAM merupakan ligan endotel untuk VLA-4 (Antigen-4 terbaru atau  $\alpha 4\beta 1$ ) dari sub family  $\beta 1$  dari integrins, dan untuk  $\alpha 4\beta 7$ . Ekspresi VCAM-1 juga teramati pada tipe sel lain (contoh : sel otot polos). Dan juga terlihat berinteraksi dengan EZR dan miosin (Barreiro *et al.*, 2002).

### 2.7.3 Farmakologi VCAM-1

Sel melanoma tertentu dapat menggunakan VCAM-1 untuk melengket pada lapisan endotel. VCAM-1 dapat berperan dalam proses perekrutan monosit pada tempat terjadi aterosklerosis. Berdasarkan peranya ini VCAM-1 merupakan target dari kerja obat. Walaupun level VCAM-1 menunjukkan kurang berhubungan langsung dengan terjadinya aterogenesis, tapi ia ikut serta dalam proses ini. VCAM-1 menstimulasi enzim NADPH oxidase, dan menghasilkan radikal bebas

*reactive oxygen species* dan merubah struktur membran sel endotelial sehingga menyebabkan meningkat migrasi leukosit kedalam daerah subendotel. VCAM-1 mempercepat pembentukan plaq aterosklerosis pada sel endotel. VCAM-1 cenderung terdeteksi didaerah rupture. Walaupun levels VCAM-1 tidak konsisten berhubungan dengan aterosklerosis, tetapi dengan meningkat VCAM-1 transkardiak berhubungan dengan disfungsi endotel koroner dan perkembangan aterosklerosis koroner (Rohatgi *et al.*, 2009; Brunton, 2008).

## 2.8 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya, contoh : Superoksida ( $O_2^*$ ) dan Hidroksil ( $OH^*$ ). Radikal bebas ini bersifat tidak stabil sehingga untuk menjadi stabil ia cenderung untuk mengambil elektron dari molekul lain, dan hal ini akan menimbulkan radikal baru molekul yang elektronnya diambil.

Oleh karena itu reaksi radikal bebas cenderung berupa reaksi rantai dan menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif, sehingga dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida (Lawrence, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2006).

### 2.8.1 Pembentukan radikal bebas Secara garis besar melalui 2 cara (Sarma. 2010) :

#### 2.8.1.1 Secara endogen

Radikal bebas yang terbentuk adalah sebagai respon normal dari peristiwa biokimia dalam tubuh. Radikal bebas ini diproduksi didalam mitokondria, membran plasma, lisosom, retikulum endoplasma dan inti sel yang berupa hasil sampingan dari proses metabolisme tubuh.



### 2.8.1.2 Secara eksogen

Radikal bebas didapat dari polusi yang berasal dari luar tubuh, seperti asap rokok, asap kendaraan bermotor, obat-obatan, pestisida, dan radiasi yang masuk serta bereaksi dalam tubuh melalui inhalasi, injeksi, makanan dan penyerapan oleh kulit.

### 2.8.2 Efek Radikal Bebas Dalam Tubuh

Dalam jumlah yang berlebihan di dalam tubuh, radikal bebas akan memberikan dampak negatif. Membran sel merupakan tempat utama terjadinya reaksi radikal bebas, karena membran sel memiliki struktur yang terdiri dari *polyunsaturated fatty acids* yang sangat mudah mengalami oksidasi. Akibat dari proses oksidasi tersebut maka permeabilitas membran sel terganggu sehingga radikal bebas akan mudah masuk ke dalam sel dan mempengaruhi atau bereaksi dengan organel sel didalamnya.

Beberapa penyakit yang dapat disebabkan oleh radikal bebas diantaranya sebagai berikut (Davies, 2005; Kumalaningsih, 2006) :

#### 2.8.2.1 Penyakit Diabetes

Pada tipe I, diabetes terjadi karena kerusakan sel  $\beta$ -pankreas. Akhir-akhir ini beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa radikal bebas oksigen berperan penting dalam patogenesis diabetes. Mekanismenya diduga melalui respon autoimun yang menghasilkan radikal bebas oksigen dan mengakibatkan kerusakan sel  $\beta$ -pankreas.

#### 2.8.2.2 Penyakit Kanker

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan komponen biokimia intrasel, misalnya DNA (gen), RNA, karbohidrat, protein,

lemak dan mikronutrien. Bila kerusakan tidak terlalu parah, masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Namun, bila sudah menyebabkan rantai DNA terputus di berbagai tempat, kerusakan ini tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pembelahan sel akan terganggu. Bahkan terjadi perubahan abnormal yang mengenai gen tertentu dalam tubuh yang dapat menimbulkan penyakit kanker.

#### 2.8.2.3 Aterosklerosis

Aterosklerosis disebabkan oleh LDL (low-density lipoprotein) yang teroksidasi oleh radikal bebas. LDL merupakan pembawa kolesterol utama dalam plasma. Akibatnya terjadi penumpukan kolesterol dan pembentukan ateroma pada dinding pembuluh darah.

#### 2.8.2.4 Penyakit Jantung Koroner

Penyakit jantung koroner adalah injuri reperfusi, yaitu otot jantung dalam keadaan iskemi diberikan aliran oksigen secara tiba-tiba. Pada saat itu terjadi banjir radikal bebas oksigen yang didahului dengan pembentukan anion superoksida, kemudian disusul dengan pembentukan radikal bebas lainnya yang diduga mengakibatkan kerusakan miokard. Semakin banyak terbentuknya radikal bebas oksigen akan semakin luas kerusakan miokard dan semakin tingginya penderita penyakit jantung koroner.

#### 2.8.2.5 Katarak

Kerusakan protein akibat elektronnya diambil oleh radikal bebas dapat mengakibatkan sel-sel jaringan dimana protein tersebut menjadi rusak. Serat-serat protein yang halus membentuk lensa internal mata bersifat bening. Kebeningan lensa secara keseluruhan bergantung pada keseragaman penampang dari serat-



serat ini serta keteraturan dan kesejajaran letaknya di dalam lensa. Ketika protein rusak, keseragaman struktur ini menghilang, dan serat-serat bukannya meneruskan cahaya secara merata, tetapi menyebabkan cahaya terpecah dan bahkan terpantul. Hasilnya adalah kerusakan penglihatan yang parah.

### **2.8.3. Kerusakan Oksidatif pada Membran Sel.**

#### **2.8.3.1 Membran sel.**

Membran sel menyelimuti sel, merupakan struktur elastis memiliki tebal 7,5 sampai 10 nanometer. Membran sel terdiri dari dua lapis lipid dan protein dengan komposisi protein 55%, fosfolipid 25%, kolesterol 13%, lipid lain 4% dan karbohidrat 3% (Guyton and Hall.,2006). Struktur lipid membran sel disusun oleh lapisan lipid ganda (*lipid bilayer*), lapisan ini terdiri dari lapisan lipid tunggal luar (*outer lipid monolayer*) dan lapisan lipid tunggal dalam (*inner lipid monolayer*). Lapisan lipid ganda ini terdiri dari molekul-molekul fosfolipid. Molekul-molekul fosfolipid terdiri dari gugus kolin, etanolamin, serin atau inositol. Bagian ini non polar dan bersifat hidrofilik. Bagian hidrofobik terdiri dari rantai hidrokarbon dari asam lemak yang membentuk ikatan ester dengan bagian gliserol dari molekul fosfolipid. Protein atau substansi lain terapung pada lapisan ganda ini (Guyton and Hall.,2006). Molekul fosfolipid dan protein didistribusikan secara tidak merata. Hal ini membuat struktur membran sel tidak simetris (Guyton and Hall.,2006).

Struktur lipid ganda membran, mempunyai sifat yang penting. Pertama, dengan adanya kandungan hidrokarbon dibagian dalam, lapisan ini tidak dapat ditembus oleh molekul-molekul yang bermuatan seperti asam amino, asam nukleat, protein, molekul gula dan ion lainnya. Kedua, lapis lipid ganda karena berbentuk cairan kental menyebabkan gerakan- gerakan difusi berbagai molekul

didalamnya (molekul protein), baik gerakan horizontal, vertikal ataupun diagonal. Hal ini penting bagi berbagai molekul protein yang berfungsi sebagai molekul untuk proses transport melalui membran (Guyton and Hall.,2006).

Disamping fosfolipid kandungan utama lapis lipid membran sel , golongan lipid lain komponen membran adalah glikolipid dan kolesterol. Glikolipid adalah senyawa turunan gliserida yang mempunyai rantai hidrokarbon yang hidrofobik dan monosakarida atau oligosakarida yang bersifat hidrofilik (Guyton and Hall.,2006).

Molekul-molekul kolesterol pada membran sel larut didalam fosfolipid membran. Molekul-molekul kolesterol menentukan permeabilitas membrane ini terhadap bahan-bahan cairan tubuh yang larut dalam air. Bertambahnya kandungan kolesterol dalam fosfolipid mengakibatkan berkurang fleksibilitas dan permeabilitas membran (Guyton and Hall, 2006).

Protein membran sel merupakan massa globular yang mengapung pada lapis lipid ganda. Sebagian besar terdiri dari glikoprotein.

Berdasarkan letak dan orientasinya, terdiri dari :

- a). Protein integral yaitu seluruh atau sebagian molekulnya berada didalam membran.
- b). Protein priferal (ekstrinsik).

Seluruh molekulnya terletak pada permukaan membran bagian dalam. Sebagian besar protein integral berupa suatu saluran struktural tempat lewat berbagai zat yang larut dalam air, terutama ion. Sehingga ion ini dapat berdifusi antara cairan ekstraseluler dan cairan intraseluler. Protein integral yang lain berfungsi sebagai protein untuk mengangkut berbagai zat lain. Protein prifer



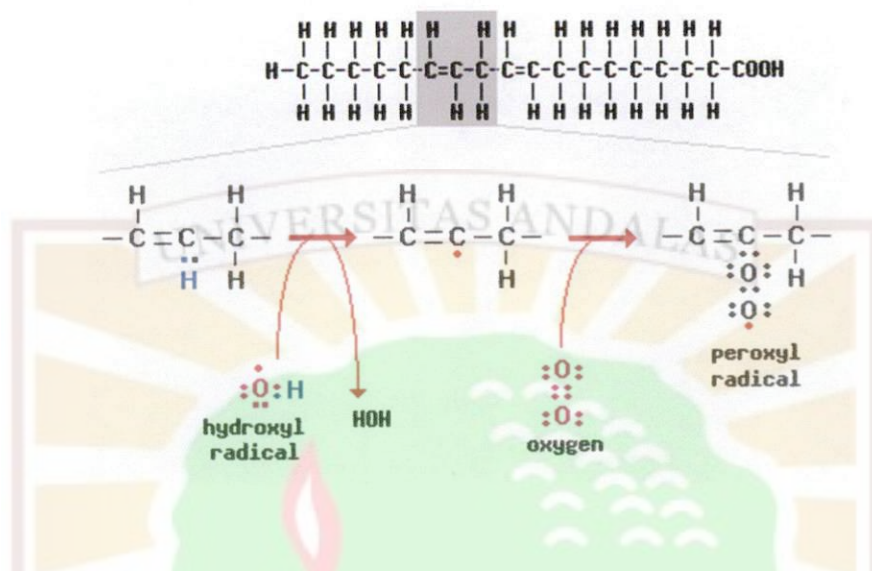
melekat pada suatu molekul protein integral. Protein ini berfungsi hampir seluruhnya sebagai enzim atau sebagai mediator fungsi intraseluler yang lain (Guyton and Hall, 2006). Telah diketahui molekul fosfolipid membran plasma sel melakukan proses pertukaran dengan molekul fosfolipid yang terkandung dalam lapisan permukaan lipoprotein. Pertukaran ini juga terjadi antara fosfolipid membran plasma sel dengan fosfolipid membran organel intraseluler. Dengan demikian perubahan yang terjadi dalam komposisi fosfolipid membran plasma akan menyebabkan gangguan terhadap berbagai proses dalam sel (Xi *et al.*, 2007).

#### 2.8.3.2 Kerusakan Oksidatif pada Membran Sel

Membran sel merupakan tempat utama reaksi radikal bebas, karena memiliki struktur yang terdiri dari *polyunsaturated fatty acids* yang mudah teroksidasi, dimana peristiwanya disebut sebagai lipid peroksidasi. Konsekuensinya akan terbentuk hidroperoksida, epoksida, aldehida dan lain sebagainya. Hilangnya asam lemak esensial pada membran plasma akan mengganggu permeabilitas membran dan radikal bebas akan semakin mudah masuk ke sel dan mempengaruhi atau bereaksi dengan organel sel.

Seperti terlihat pada gambar 2.8 komponen fosfolipid dan glikoprotein membran lipid, ke dua asam lemak ini mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rawan terhadap serangan radikal bebas, terutama radikal hidroksil. Bila radikal hidroksil bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ini, maka akan terjadi reaksi berantai yang dikenal sebagai peroksidasi lipid (Halliwell and Gutteridge, 2006; Xi *et al* 2007). Tappel 1962, melaporkan implikasi biopatologi yang timbul pada kondisi defisiensi vitamin E. Sekarang telah diyakini bahwa peroksidasi

lipid adalah suatu reaksi akibat pembentukan radikal bebas di dalam sel dan jaringan (Xi *et al.*, 2007).



Gambar 2.8 Mekanisme peroksidasi lipid (Bowen, 2010)

Diperkenalkan oleh Tappel 1962, Tappel melaporkan, implikasi biopatologi yang timbul pada kondisi defisiensi vitamin E. Sekarang telah diyakini bahwa peroksidasi lipid adalah suatu reaksi akibat pembentukan radikal bebas di dalam sel dan jaringan (Xi *et al.*, 2007). Peroksidasi lipid terbentuk melalui proses inisiasi, propagasi dan terminasi (Halliwell and Gutteridge, 2006; Simanjuntak 2006; Xi, 2007).

#### a). Inisiasi

seperti terlihat pada gambar 2.8 inisiasi merupakan langkah awal dari serangkaian peroksidasi yang terjadi pada asam lemak tak jenuh (*poly unsaturated fatty acids* = PUPA). Reaksi ini akibat serangan beberapa spesies pada alilik hidrogen pada atom karbon ikatan rangkap dua. ROS dapat memutuskan atom



hidrogen adalah hidroksi ( $\text{OH}^*$ ), radikal alkoksil ( $\text{ROO}^*$ ), tetapi  $\text{H}_2\text{O}_2$  ataupun  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tidak (Halliwell and Gutteridge, 2006).

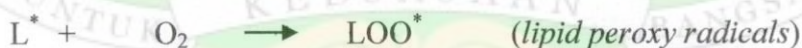
Akibat serangan ini, akan terjadi pemutusan atom H ( $\text{H}^*$ ) dari gugus metilen ( $-\text{CH}_2-$ ). Oleh karena atom hidrogen ini hanya memiliki satu elektron, maka akan menghasilkan elektron yang tidak berpasangan pada karbon ( $-\text{CH}^*$ ) sehingga terbentuk *fatty acids radical*.



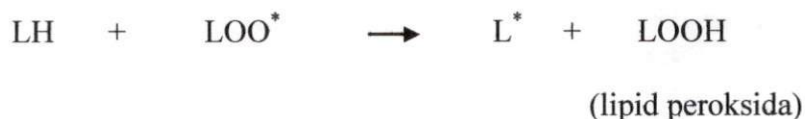
Radikal karbon biasanya distabilkan oleh molekul untuk membentuk *conjugated dienes*. Radikal karbon yang terbentuk dapat mengalami berbagai reaksi seperti 2 diantaranya akan saling bertabrakan didalam membran, sehingga dapat menjadi inisiasiator pada proses ini. Kebanyakan dari karbon radikal (carbon-centered radicals) akan bereaksi dengan  $\text{O}_2$  (Halliwell and Gutteridge, 2004).

b). Propagasi.

Seperti terlihat pada gambar 2.8 Karbon radikal seperti lemak radikal dengan mudah bereaksi dengan oksigen untuk membentuk *oxygen-centered (peroxy radicals)* ( $\text{LOO}^*$ ).

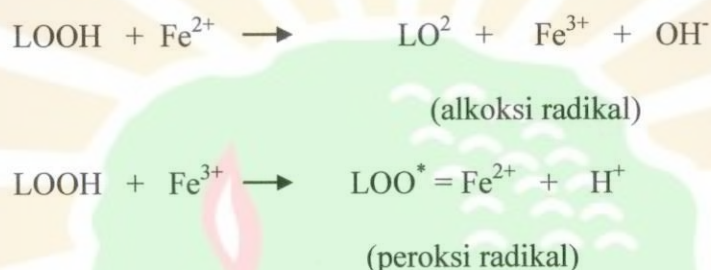


*lipid peroxy radicals* ini dapat memutuskan hidrogen dari PUPA yang berdekatan, sehingga membentuk lipid peroksida ( $\text{LOOH}$ ).



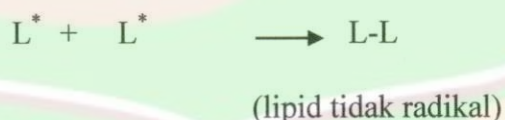
Reaksi *lipid peroxy radicals* dengan PUPA akan menghasilkan *lipid radicals* yang baru, sehingga menambah jumlah radikal lipid pada reaksi rantai ini (Halliwell and Gutteridge.,2004).

Dekomposisi dari hidroksi peroksida dikatalisator oleh ion Fe dan logam transisi lainya dengan menghasilkan radikal alkoksi, sehingga meningkatkan propagasi. Akibat generasi kedua dari radikal bebas ini dapat menginisiasi pembentukan rantai baru dari lipid peroksida. (Halliwell and Gutteridge.,2004).



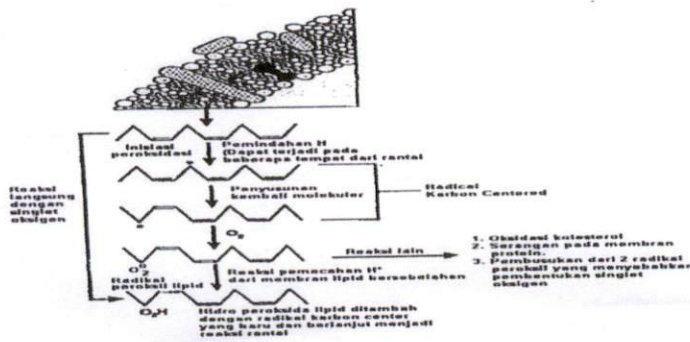
#### c). Terminasi

Reaksi rantai ini dapat berakhir bila terjadi penggabungan 2 lipid radikal untuk membentuk asam lemak yang tidak radikal atau antara radikal dengan satu senyawa pembasmi radikal ( antioksidan). (Halliwell and Gutteridge, 2004).



Pemisahan  $\text{H}^{\cdot}$  dari PUFA dapat terjadi pada tempat yang berlainan dari rantai karbon, sehingga menghasilkan bermacam-macam produk. Contoh: peroksidasi asam linoleat akan menghasikan 2 hidroperoksida, asam linoleat akan menghasilkan 4 hidroperoksida, asam arakhidonat akan menghasilkan 6 hidroksi peroksida seperti siklik peroksida (Halliwell and Gutteridge., 2006).





Gambar 2.8 Representasi reaksi inisiasi dan propagasi dari peroksidasi lipid (Halliwell, 2006).

#### 2.8.4 Kerusakan oksidatif pada kolesterol.

Kolesterol yang terdapat dalam lipid membran dan lipo protein dapat mengalami oksidasi. Hasil penelitian mempunyai efek yang berbeda. Hal ini mungkin disebabkan karena kebanyakan penelitian menggunakan bentuk campuran yang kompleks (Halliwell and Gutteridge.,2006; Simanjuntak 2006 ; Xi *et al* 2007).

#### 2.8.5 Kerusakan lipid membran

Akibat peroksidasi lipid akan terjadi kerusakan struktur protein membran dan fungsinya. Selama peroksidasi lipid, 2 asam lemak yang berdekatan akan berikatan dengan cara tidak normal. Hal ini akan menyebabkan struktur enzim rusak, karena beberapa protein membran strukturnya berikatan dengan membran lipid yang berdekatan. Disamping itu produk dari radikal peroksi, aldehid (terutama HNE) dan produk yang lainya yang terdapat didalam membran dan lipoprotein yang terjadi selama peroksidasi lipid akan menimbulkan kerusakan berat pada membran protein. Radikal peroksi lipid dapat memutus atom hidrogen dari protein disampingnya juga akan menghasilkan ikatan silang (*cross-linking*)

lipid-protein dan protein- protein. Aldehid seperti 4-hidroxy alkenal dapat berikatan dengan gugus SH dari protein. Aldehid dapat juga bereaksi dengan gugus amino dari asam amino, protein, fosfolipid dan asam nukleat (Halliwell and Gutteridge., 2006).

Telah dibuktikan, bahwa peroksidasi yang terjadi pada membran sel hati dan eritrosit akan menyebabkan pembentukan sejumlah molekular radikal protein didalam membran. Akibatnya molekul reseptor dipermukaan sel yang merespon hormon dan sitokin akan menjadi tidak aktif. Disamping itu beberapa enzim juga tidak aktif dan selama peroksidasi lipid juga akan terjadi kerusakan saluran  $K^+$  (Halliwell and Gutteridge.,2006).

#### **2.8.6 Kerusakan membran yang terjadi akibat peroksidasi lipid.**

Peroksidasi lipid akan menyebabkan penurunan pengaliran cairan melalui membran. Hal ini akan memudahkan fosfolipid pada saling berpindah tempat, sehingga meningkatkan kebocoran membran dua lapis lipid ini terhadap substansi yang secara normal tidak dapat melalui saluran tersebut (seperti ion  $Ca$ ). Ikatan silang pada membrane protein menyebabkan menurunnya mobilitas terhadap lateral dan rotasional dari membran ini, sehingga menurunkan fungsi membrane. Produksi hidroperoksida dan karbonil pada daerah hidrofosfolipid menyebabkan pembentukan pusat hidrofilik yang akan mempengaruhi fungsi membran. Ini akan meningkatkan permeabilitas membran, sehingga terjadi pembengkakan mitokondria, pembentukan vesikula pada retikulum endoplasma, kebocoran enzim dan ko-enzim ke sel yang tersisa dan menimbulkan kerusakan yang lebih lanjut (Halliwell and Gutteridge.,2006).



Oksidasi yang berlanjut rantai samping asam lemak dan fragmentasi asam lemak ini akan menghasilkan aldehid dan hidrokarbon (seperti pentana), akan menyebabkan membran kehilangan integritas yang akan menyebabkan kematian sel. DNA yang tidak dilapisi oleh histon dapat dengan mudah dimodifikasi oleh hasil- hasil produksi reaksi ini. Kerusakan yang terjadi pada retikulum endoplasma kasar oleh peroksidasi juga akan mengurangi kesanggupan sel untuk mensintesa dan dan mensekresikan protein (Halliwell and Gutteridge.,2006).

Kerusakan sel yang disebabkan oleh ROS akan meningkatkan inisiasi sinyal pada jalur kematian sel yang terprogram, sehingga menimbulkan apoptosis. Ini dapat dilihat pada cell line pre BGB 11, yang dipapari AAPH. AAPH akan menyebabkan stres oksidatif yang menimbulkan kerusakan membran. Kerusakan komponen sel akan memicu sinyal apoptotik baik secara langsung ataupun tidak langsung dengan memproduksi mediator seperti derivat hidroperoksida ataupun aldehid (Halliwell and Gutteridge.,2006).

## **2.9 Antioksidan.**

Proses oksidasi pada pembentukan energi metabolik akan menghasilkan zat lain yang membentuk ROS/RNS. Untuk menanggulangi pembentukan senyawa ini serta akibat yang ditimbulkannya pada organisme, maka organisme akan berusaha melindungi terhadap pengaruh ROS/RNS tersebut. Proses perlindungan ini diperoleh dari senyawa yang dapat merubah ROS/RNS menjadi senyawa yang tidak aktif, antara lain dengan proses reduksi. Senyawa ini dikenal dengan nama antioksidan (Halliwell and Gutteridge, 2007; Davies 2005; Kumalaningsih, 2007).

### 2.9.1 Peranan Antioksidan dengan beberapa cara:

- a). Berperan sebagai penyapu, pembersih (*scavenger*) radikal bebas atau senyawa reaktif yang dihasilkan oleh proses oksidatif.
- b). Berperan sebagai pencegah (*interceptor*) terhadap radikal bebas tersebut.
- c). Berperan sebagai pengikat atau pengasingan (*sequester*) bahan-bahan pro-oksidan seperti ion Fe, Cu dan hem, sehingga pro-oksidan tersebut tidak bekerja.
- d). Berperan sebagai pelindung biomolekul terhadap kerusakan, terutama kerusakan oksidatif (Setiati., 2003). Seperti terlihat pada tabel 2.5 diatas

### 2.9.2 Aktifitas Antioksidan di tingkat sel

Antioksidan yang berperan terhadap terbentuknya radikal hidroksil adalah enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Pembentukan senyawa oksigen reaktif akan menyebabkan peningkatan enzim sebagai antioksidan tubuh. Satu molekul enzim antioksidan ini dapat menetralkan beberapa ratus radikal bebas. Tetapi bila terjadi induksi terus menerus, maka enzim ini akan menurun dan akhirnya akan kehilangan fungsinya. Penurunan dan hilangnya fungsi enzim ini serta peningkatan MDA (malondialdehid), merupakan *biomarkers* dari kerusakan oksidatif. Antioksidan yang bekerja di membran sel, berfungsi sebagai pemutus rantai. Termasuk kelompok ini adalah : vitamin E,  $\beta$  karoten dan koenzim Q (Hariyatmi, 2004).

Antioksidan yang bekerja ekstraselulair. Kelompok ini berfungsi mencegah terbentuknya logam transisi Fe dan Cu. Termasuk kelompok ini adalah: Transferin, laktoferin dan Seruloplasmin (Setiati, 2003; Halliwell and Gutteridge, 2004).



### 2.9.3 Penggolongan antioksidan secara umum

Antioksidan secara umum dapat digolongkan atas:

#### 2.9.3.1 Antioksidan enzimatik

#### 2.9.3.2 Antioksidan yang bekerja mengikat berbagai bahan pro-oksidan

#### 2.9.3.3 Antioksidan dengan berat molekul rendah yang disintesa oleh tubuh sendiri.

#### 2.9.3.4 Antioksidan dengan berat molekul ringan yang berasal dari luar tubuh

Seperti dari makanan (Halliwell and Gutteridge, 2004).

Antioksidan ini dapat dibuat oleh organisme sendiri secara endogen atau yang berasal dari luar tubuh organisme secara eksogen. Antioksidan endogen dapat diinduksi aktifitasnya bila lingkungannya terganggu oleh radikal bebas atau oleh beberapa molekul sitokin (Kumalaningsih, 2007).

### 2.9.4 Antioksidan dengan berat molekul rendah yang berasal dari luar tubuh (Antioksidan eksogen)

Antioksidan eksogen dikenal juga sebagai antioksidan sekunder. Antioksidan ini akan bekerja sama dengan antioksidan yang dibentuk oleh tubuh sendiri yang merupakan lini terdepan terhadap serbuan oksidan (Setiati., 2003).

#### 2.9.4.1 Antioksidan eksogen bekerja melalui tiga mekanisme yaitu:

- a). Pemutusan rantai propagasi dari radikal bebas (*free radical chain breaking*). Antioksidan disini berperan sebagai donor hidrogen atau akseptor hidrogen, sehingga terjadi pembersihan (*scavenging*) atau pencegahan (*intercept*) terhadap radikal bebas tersebut (Aqil, 2006)
- b). Melalui mekanisme khelasi sebagai donor hidrogen atau akseptor hidrogen sehingga ion-ion metal itu diasingkan (*sequestration*) dan efek pro-oksidan dari metal itu dapat dihambat.

c). Memadamkan (*quenching*) pengaruh dari singlet oksigen (Lawrence, 2004; Sauriasari, 2006).

#### 2.9.4.2 Antioksidan eksogen dapat berupa:

- a). Mikronutrien yang terdiri atas vitamin-vitamin, seperti vitamin C, vitamin E dan  $\beta$  karoten.
- b). Antioksidan alamiah (*internal antioxidant*), yaitu zat-zat yang berasal dari senyawa, buah-buahan, rempah-rempah dan lain-lain.
- c). Senyawa kimia, sintetis maupun non sintetis

### 2.9.5. Mikronutrien yang terdiri atas vitamin-vitamin, seperti vitamin C, vitamin E dan $\beta$ karoten.

#### 2.9.5.1 Asam askorbat (vitamin C).

Asam askorbat merupakan antioksidan yang larut dalam air. Mekanisme kerjanya, langsung menangkap radikal bebas (*scavenging*) dalam plasma (Sitompul, 2003). Salah satu sifat yang menyolok dari sifat asam askorbat adalah kemampuannya sebagai agen pereduksi (Halliwell and Gutteridge 2006), sehingga mereduksi  $\alpha$ -tokoferol peroksil radikal menjadi tokoferol tereduksi. Tokoferol tereduksi mempunyai efek pencegat (*interceptor*) terhadap radikal bebas di membran sel sehingga fungsi membrane kembali pulih (Sauriasari, 2006; Tavarini, 2008).

Perubahan kadar vitamin C dalam plasma merupakan suatu marker dari stres oksidatif seperti yang terjadi pada perokok (Sauriasari, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Marangon et al, 1998, menemukan bahwa asam askorbat plasma akan menurun pada perokok dibandingkan dengan orang normal ( $p < 0,05$ ) dalam status diet yang sama. Dengan pemberian suplemen vitamin C 600 mg



perhari, terjadi peningkatan asam askorbat plasma ( $p < 0,05$ ) (Steinberg and chait., 1998). Para peneliti lain juga mengatakan rendahnya kadar vitamin C plasma adalah faktor independen untuk sindrom koroner akut (Sauriasari, 2006).

Sebagai marker dari stres oksidatif, kadar vitamin C dalam plasma sebanding dengan kadar peroksidasi lemak. Bila kadar vitamin C dalam plasma tinggi, peroksidasi lemak dalam plasma hampir tidak ada, sebaliknya bila kadar vitamin C dalam plasma rendah, maka akan terjadi peningkatan peroksidasi lemak, walaupun kadar vitamin E dan  $\beta$  karoten cukup tinggi (Sitompul, 2003).

Salah satu peran asam askorbat yang tidak menguntungkan adalah bila terdapat ion logam transisi seperti besi dan tembaga. Asam askorbat akan berperan sebagai pro-oksidan, dimana awalnya bekerja sebagai zat pereduksi ion feri dan reaksi selanjutnya akan menghasilkan  $\text{OH}^*$  (reaksi Fenton).



Akan tetapi, karena ion-ion logam ini dalam jumlah yang sedikit, maka sifat antioksidan asam askorbat lebih menonjol. Askorbat akan menjadi toksik bila diberikan pada penderita dengan penyakit kelebihan besi secara bersama (Halliwell and Gutteridge, 2004; Sauriasari, 2006).

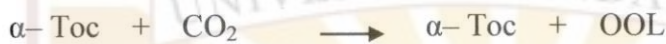
#### 2.9.5.2 Vitamin E.

Peranan Vitamin E sebagai antioksidan dapat berupa penyapu (*scavenger*) radikal peroksil, menghambat reaksi rantai dari peroksidasi lipid. Tokoferol dan tokotrinol dapat mencegah pembentukan peroksidasi lipid, karena mereka dapat membersihkan (*scavenger*) radikal peroksidasi lipid ( $\text{LO}_2^{*-}$ ) lebih cepat dari reaksi

radikal ini dengan sisa rantai asam lemak yang berdampingan atau dengan membran protein.



Radikal  $\alpha\text{-Toc}^0$  akan bereaksi lagi dengan radikal peroksil untuk membentuk produk yang tidak bersifat radikal, seperti tokoferol yang dihidrolisa menjadi tokoferil quinon dan efoksi quinon.



Satu molekul tokoferol dapat mengakhiri kerja dua reaksi rantai peroksidasi (Halliwell., 1994; Halliwell and Gutteridge, 2004; Sauriasari, 2006).

Disamping itu tokoferol juga bereaksi dengan singlet oksigen dan melindungi membran terhadap senyawa ini.  $\alpha$ -tokoferol dalam konsentrasi tinggi membuat membran jadi stabil. Sebagai contoh, asupan yang tinggi dari suplemen vitamin E akan mengurangi agregasi platelet (Halliwell and Gutteridge, 2004). Penelitian lain juga menunjukkan  $\alpha$ -tokoferol dapat menurunkan proliferasi kultur sel otot polos yang diambil dari dinding pembuluh darah (Halliwell and Gutteridge, 2004).

Tokoferol karena larut dalam lemak, cenderung terakumulasi pada lipoprotein membran sel bagian dalam dan akan mencegah (*intercept*) propagasi radikal bebas, sehingga melindungi struktur lipid membran dan kerusakan oleh proses oleh proses oksidatif. Molekul vitamin E dapat melindungi lebih kurang seribu molekul lipid membran terhadap serangan peroksidatif (Halliwell and Gutteridge, 2004; Sauriasari, 2006).  $\alpha$  tokotrinol mempunyai efek yang lebih kuat dari  $\alpha$ -tokoferol dalam mencegah peroksidasi lipid. Hal in disebabkan karena



distribusi pada dua lapis lipid membra lebih baik dan lebih efektif menangkap radikal bebas (Halliwell and Gutteridge, 2004; Sauriasari, 2006).

#### 2.9.5.3 Karotenoid

Peranan  $\beta$  karoten sebagai antioksidan adalah mencegah pembentukan singlet oksigen pada proses peroksidasi lipid (Sauriasari, 2006). Satu molekul karotenoid sanggup menyapu (*scavenger*) tiga puluh radikal peroksil (Halliwell and Gutteridge, 2004). Karotenoid sanggup bereaksi dengan berbagai-bagai radikal. Di dalam membran terdapat vitamin E dan  $\beta$  karoten dan ubiquinol yang juga bersifat *scavenger*, sehingga akan terjadi interaksi antara vitamin E dan  $\beta$  karoten dengan berbagai radikal. Sekarang, penelitian mengenai peranan antioksidan  $\beta$  karoten terhadap berbagai penyakit banyak dilakukan (Halliwell and Gutteridge, 2004; Tavarini *et al*, 2008).

#### 2.9.6 Antioksidan alamiah (*internal antioxidant*), yaitu zat-zat yang berasal dari senyawa, buah-buahan, rempah-rempah dan lain-lain.

Senyawa-senyawa fenolat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, adalah senyawa yang didalam molekulnya mempunyai gugus fenol, Fenol adalah senyawa memiliki intibenzen yang mempunyai gugus-OH. Secara *invitro*, senyawa fenolat ini dapat menghambat peroksidasi lipid dan proses lipoksigenasi. Tetapi perannya secara *in vivo* masih sangat terbatas, walaupun diketahui bahwa efek antioksidan senyawa-senyawa ini sangat kuat memutus rantai radikal peroksil melalui *scavenge*. Senyawa-senyawa ini dianggap sebagai antioksidan tambahan dalam bahan makanan (Halliwell and Gutteridge, 2007; Sauriasari, 2006; Tavarini *et al*, 2008).

Senyawa anti oksidan alami terdiri dari fenolik, polifenol yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, dan kalkon (Pratt, 1992; Shahidi, 1997). Ekstrak terpurifikasi ini adalah multifungsional dan dapat bereaksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, (d) Peredam terbentuknya singlet oksigen (Heim *et al* 2002, Tavarini *et al* 2008).

#### **2.9.7 Senyawa kimia, sintetik maupun non sintetik (Sauriasari, 2006).**

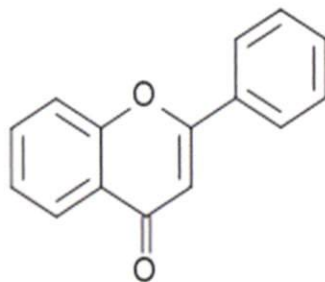
Antioksidan sintetik terutama digunakan sebagai pengawet. Di klinik, senyawa ini digunakan sebagai pengobatan terhadap berbagai penyakit tertentu. Beberapa senyawa yang tersedia yaitu Probukol, Trolox, Butylated-hidroxy-amizol (BHA), Larazoid dan Carvediol (Heim *et al* , 2002; Brown, 2005; ).

#### **2.10 Flavonoid**

Flavonoid (bioflavonoid), dikenal sebagai vitamin P, senyawa ini adalah hasil metabolit sekunder dari tanaman. Suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar luas ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan ekstrak terpurifikasi yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari 3 atom karbon seperti terpapar pada Gambar 2.10 (Markham. 1988; Ververidis *et al.*, 2007).

Flavonoid tersebar pada semua bagian tanaman seperti pada daun, bunga, buah, biji, akar, kayu, kulit kayu, tepung sari, batang dan getah. Biasanya flavonoid glikosida dijumpai pada vakuola dan beberapa diantaranya terdapat dalam kloroplas dan kromoplas, aglikon yang kurang polar ditemukan pada jaringan lilin kutikula sedangkan biflavonoid dalam kulit luar tumbuhan.





Gambar 2.10. Kerangka dasar senyawa Flavonoid (Harbone 1999)

Angiospermae merupakan tumbuhan yang paling banyak menghasilkan flavonoid, kemudian gymnospermae, serta sedikit fungi dan paku. Pada umumnya flavonoid terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida. Menurut Markham 1988 dan Harborne 1974 dalam satu tumbuhan mungkin saja bentuk kombinasi dengan beberapa glikosida (Markham, 1988; Ververidis, *et al* 2007).

### 2.10.1 Biosintesis Flavonoid

Tahap-tahap pertama dari biosintesa flavonoid suatu unit  $C_6-C_3$  berkombinasi dengan tiga unit  $C_2$  menghasilkan  $C_6-C_3-(C_2+C_2+C_2)$ ,  $C_{15}$  yang dihasilkan dari kombinasi ini telah mengandung gugus fungsi oksigen pada posisi-posisi yang diperlukan (Heim, *et al* 2002; Trantas, 2009).

Cincin A dari struktur flavonoid berasal dari jalur poliketida, yakni kondensasi dari tiga unit asetat atau malonat, sedangkan cincin B dan tiga atom karbon dari rantai propan berasal dari jalur fenilpropanoid (jalur shikimat). Dengan demikian kerangka flavonoid dihasilkan dari kombinasi antara dua jalur biosintesa yang utama untuk cincin aromatik, yakni jalur shikimat dan jalur asetat-malonat. Selanjutnya, sebagai akibat dari berbagai perubahan yang disebabkan oleh enzim, ketiga atom dari rantai propana dapat menghasilkan berbagai gugus

fungsi, seperti ikatan rangkap, gugus hidroksil, gugus karbonil, dan sebagainya (Heim, *et al* 2002;Trantas, 2009).

### 2.10.2 Klasifikasi flavonoid

Semua flavonoid menurut strukturnya, merupakan turunan senyawa induk flavon terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang ditemui tunggal dalam jaringan tumbuhan. Bentuk campuran terdiri atas flavonoid berbeda kelompok. Hasil penelitian terbaru membuktikan bahwa flavon merupakan ko-pigmen penting yang menentukan warna antosianin dalam bunga.

Penggolongan jenis flavonoid berdasarkan kepada kelarutannya dan reaksi warna. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak yang telah dihidrolisis, secara kromatografi satu arah. Pemeriksaan ekstrak etanol secara kromatografi dua arah. Terakhir flavonoid dipisahkan dengan cara kromatografi kolom. Masing-masingnya diidentifikasi dengan membandingkan kromatografi dan spektrum, dengan memakai senyawa pembanding yang sudah dikenal (Harbone, 1999; Ververidis, *et al* 2007).

### 2.10.3 Golongan dan Penyebaran Flavonoid

Semua flavonoid menurut strukturnya, merupakan turunan senyawa induk flavon yang terdapat pada tumbuhan, semuanya mempunyai sifat yang sama. Dikenal sekitar 8 kelompok flavonoid yaitu : (Harbone, 1999; Ververidis, *et al* 2007)

2.10.3.1 Antosianin terdapat berupa pigmen bunga merah marak, merah, biru dan juga ada pada daun.

2.10.3.2 Proantosianidin terdapat dalam dan daun tumbuhan berkayu

2.10.3.3 Flavonol terdapat terutama ko-pigmen dalam bunga sianik tersebar dalam



daun

2.10.3.4 Glikoflavon seperti flavonol

2.10.3.5 Biflavonil hampir seluruhnya ada pada gimnospermae

2.10.3.6 Khalkon dan Auron adalah merupakan pigmen warna kuning, kadang-kadang juga terdapat dalam jaringan lain.

2.10.3.7 Flavonon terdapat dalam daun dan buah citrus

2.10.3.2 Isoflavon seringkali terdapat dalam akar suku leguminose

Khalkon, auron, flavon, dihidrokalkon dan isoflavon disebut flavonoid minor. Karena penyebaran masing-masing kelompok ini terbatas. Misalnya isoflavon pada Leguminose dan Iridaceae. Tetapi mungkin saja lebih tersebar dari pada yang telah diketahui sekarang .

#### **2.10.4 Pemeriksaan flavonoid dalam ekstrak etanol**

Cara menelaah flavonoid dalam jaringan tumbuhan ialah secara akromatografi kertas dua arah dari ekstrak etanol yang diperoleh. Pengembangan yang digunakan adalah *n*-butanol-asam asetat-air (BAA) dengan perbandingan 4: 1: 5 dan asam asetat 5%. Pembanding baku yang digunakan adalah pada kromatogram adalah ialah senyawa rutin ( glikosida flavonol ) (Harbone, 1999).

#### **2.10.5 Bioaktivitas Flavonoid**

Senyawa flavonoid sangat bermanfaat dalam makanan karena, berupa senyawa fenolik yang bersifat anti oksidan. Flavonoid memiliki kemampuan untuk menghilangkan dan secara efektif “ Menyapu “ ROS yang merusak oleh karena makan yang banyak mengandung flavonoid dianggap penting untuk mencegah penyakit-penyakit kanker dan jantung (yang diperburuk oleh akibat oksidasi LDL) ( Hienrich *et al.*, 2005)

Kuersetin suatu flavonoid yang banyak terdapat dalam berbagai bahan makanan, merupakan antioksidan kuat. Kandungan *milk thistle* ( *Silybum marianum* ) terutama silibin bersifat antihepatotoksin. Ekstrak *milk thistle* yang dikenal dengan nama silimarin dan digunakan untuk mengurangi efek keracunan fungi genus *Amanita*, yang memproduksi racun peptida yang mematikan, yaitu senyawa amanitin. Mekanisme kerja antihepatotoksin ini belum sepenuhnya dipahami, diduga senyawa ini melindungi sel hati dengan mengurangi masuknya peptida toksik melalui membran sel dan berkerja sebagai antitoksidan penghilang radikal bebas penyebab hepatotoksisitas (Heim, *et al* 2002; Hienrich *et al.*, 2005).

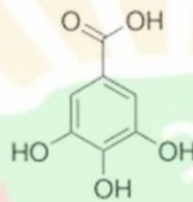
Kelompok senyawa stilben berkaitan dengan flavonoid terutama resveratrol, suatu komponen dalam anggur merah yang memiliki aktivitas antioksidan, antikanker dan antiradang. Penduduk Perancis yang mengkonsumsi makanan asam lemak jumlah tinggi menunjukkan insiden penyakit jantung yang rendah. Rendahnya laju penyakit jantung ini diduga akibat mengkonsumsi anggur merah, yang kaya dengan resveratrol dan flavonoid lainnya, senyawa ini telah diketahui bersifat kardioprotektif. Fenomena ini dikenal dengan “*French paradox*” dan para ahli jantung menyarankan pasien yang memiliki riwayat penyakit jantung untuk mengkonsumsi segelas anggur merah perhari ( Hienrich *et al.*, 2005).

Aktivitas antioksidan flavonoid ini membantu pencegahan kerusakan sel dari stress oksidatif yang dapat menyebabkan kanker, penuaan, aterosklerosis, inflamasi dan penyakit saraf (Parkinson's and Alzheimer's) serta menurunkan resiko kanker paru dan kanker pancreas pada perokok. Disamping itu juga dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan diabetes mellitus dengan menghambat



kerja enzim aldosa reduktase dalam pembentukan sorbitol. Flavonoid sering juga digunakan untuk menyembuhkan beberapa penyakit antara lain pendarahan selaput jala (retinal hemoragik), hipertensi, yang disebabkan naiknya fragilitas kapiler, pendarahan yang bersifat keturunan seperti haemofilia dan pendarahan gusi (Heim, *et al* 2002; Bobe *et al.*, 2008; Ping *et al.*, 2009).

## 2. 11. Asam galat



3,4,5-trihydroxybenzoic acid

Nama lain: Acidum Gallicum. Gallic acid, Gallate, 3,4,5-trihydroxybenzoate

Rumus molekul:  $C_6H_2(OH)_3COOH, H_2O$

Berat molekul: 170.12 g/mol

Organoleptis: Putih, putih-kekuningan atau kristal berwarna coklat-kekuningan pucat. Berat jenis  $1.7 \text{ g/cm}^3$  (anhidrat). Kelarutan dalam air 1 dalam 100 bagian air, dalam air mendidih 1 dalam 3 bagian air mendidih, alkohol 1 dalam 8 alkohol, 1 gliserin dalam 6 bagian gliserin. Keasaman ( $pK_a$ )  $COOH$ : 4.5,  $OH$ : 10

Asam galat adalah senyawa golongan asam fenolik  $C_6-C_1$  atau hidroksi benzoat, yaitu asam 3,4,5-trihidroksibenzoat. Asal kata galat adalah dari kata *galle* dalam bahasa Prancis yang berarti pembengkakan pada jaringan tanaman setelah terserang serangga parasit. Senyawa ini dapat ditemukan pada daun ek dan anggur dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan (penangkal radikal bebas). Asam galat adalah subunit dari galotanin, yaitu polimer heterogen yang mengandung molekul

asam galat yang saling terikat satu dengan asam galat lain serta dengan sukrosa atau gula lainnya (Dewick, 1969; Pathak., *et el* ).

### **Biosintesis**

Asam galat merupakan senyawa turunan asam sinamat yang biosintesisnya melalui jalur asam sikimat dengan bahan dasar asam 3-dehidrosikimat. Reaksi penting dalam pembentukan asam sinamat dan berbagai turunannya adalah pengubahan fenilalanin menjadi asam sinamat melalui proses deaminasi atau pelepasan amonia dari fenilalanin untuk membentuk asam sinamat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim fenilalanin amonia liase. Berikutnya asam sinamat diubah menjadi p-kumarat dengan penambahan satu atom oksigen dari O<sub>2</sub> dan atom H dari NADPH langsung pada posisi para dari asam sinamat (posisi atom karbon keempat dihitung dari gugus asam sinamat pada cincin benzena). Penambahan gugus hidroksil (OH) lainnya di sebelah gugus OH dari asam p-kumarat dengan reaksi serupa menghasilkan asam kafeat. Penambahan gugus metil (-CH<sub>3</sub>) dari S-adenosil metionin (SAM) e gugus OH dari asam kafeat menghasilkan asam ferulat. Asam kafeat membentuk ester dengan gugus alkohol dalam asam lainnya yang terbentuk pada lintasan asam sikimat, yaitu asam quinat, dan menghasilkan asam klorogenat. Asam galat dibentuk 3-dehydroshikimate dengan bantuan enzim shikimate dehydrogenase menjadi 3,5-didehydroshikimate, dengan spontan berubah jadi asam galat (Dewick and Haslam, 1969)

### **Sumber asam galat di alam:**

Tanaman yang mengandung asam galat adalah seperti spesies oaks di Amerika Utara yaitu *Quercus alba* dan *Quercus robur*, di Eropa *Caesalpinia*



*mimosoides*, kulit batang *Boswellia dalzielii*, *Drosera* (sundew), *Rhodiola rosea* (akar emas), Triphala (Ayurvedic herbal rasayana formula), *Toona sinensis*

Makanan yang mengandung asam galat

Biji pinang, bearberry (*Arctostaphylos sp*), *Bergenia sp*, blackberry, coklat, *Juglans regia*, daun dan kulit mangga, buah (*Phyllanthus emblica*, raspberry, *Syzygium aromaticum* (cengkeh), vinegar, anggur, *Hamamelis virginiana*, teh putih (Pathak, *et al*, 2004)

### Metabolisme

Dimetabolisme oleh enzim Gallate 1-beta-glucosyltransferase menghasilkan 1-galloyl-beta-D-glucose dan enzim Gallate decarboxylase

### Kegunaan dan aktivitas asam galat:

N-alkil ester sintetik dari asam galat, juga dikenal sebagai gallates, secara luas digunakan sebagai antioksidan oleh industri makanan dan farmasi. Selain aktivitas antioksidan, aktivitas biologis lainnya telah dijelaskan untuk kelompok molekul, terutama antikanker, antibakteri, dan sifat antijamur. Kedua senyawa in berefek anti-herpes simplex virus HSV-2 dengan mengurangi replikasinya, aktivitas anti-HSV-2 asam galat dan gallate pentil adalah sebagai virucidal pada partikel virus, kemungkinan dengan penghambatan perlengketan virus ke sel. Senyawa ini dapat dianggap sebagai kandidat yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai anti-HSV-2 topikal (Kratz *et al.*, 2008).

Asam galat digunakan sebagai astrigen pada kasus haemoragik membantu induksi vasokonstriksi. Digunakan mengurangi albuminuria, diabetes dan berkeringat malam, tetapi belum ada bukti yang cukup penggunaan ini. Digunakan untuk mengobati psoriasis secara lokal dalam bentuk salep dan wasir penggunaan secara eksternal. Umumnya digunakan bentuk serbuk campuran dan tanpa memakai suspending agent. Tidak tercampurkan dengan spiritus eter nitrosa dan garam besi. Asam galat terdapat dalam campuran dengan senyawa lain seperti bismut subgalat (Dermatol) yang digunakan sebagai antseptik dan disinfektan , Gallanol untuk obat haemoroid, metil ester asam galat (Gallicin), and dibromogallic acid (Gallobromol).

Hasil Penelitian yang dilakukan Murase (1999), memberikan bukti bahwa asam galat, senyawa fenolik alami, dapat menekan sitokin yang daktivasi oleh necrosis factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dan menekan ekspresi ELAMs, seperti VCAM-1, ICAM-1, dan E-selectin. Asam galat juga dapat menghambat ekspresi gen NF- $\kappa$ B yang berkaitan dengan aterogenesis dan dengan demikian asam galat dapat melindungi perkembangan aterosklerosis in vivo (Murase ,1999).

Peneliti lain melaporkan bahwa asam galat menyebabkan peningkatan yang signifikan aktivitas gen phenol sulfotransferase (PST-P) dalam hepatoma manusia . Selain itu, asam galat meningkatkan tingkat nuklear transcription factor (Nrf2), yaitu faktor transkripsi yang mengatur antioksidan respon (ARE). menunjukkan peningkatan pengikatan protein nukleus penginduksi PST-P. Asam galat mengaktifkan gen p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). Asam galat juga menyebabkan akumulasi Nrf2. Selain itu, efek proteksi asam galat ini diberikan oleh gugus butil hidroperoksida. Asam galat meredam reaksi stres



oksidatif melalui jalur p38 MAPK dan PST-P. Hasil ini menunjukkan bahwa asam galat bertanggung jawab atas sitoproteksi terhadap kerusakan oksidatif (Chi and Gow, 2005).

Studi epidemiologis menunjukkan ada hubungan positif antara asupan makanan yang kaya antosianin dan asam galat terhadap perlindungannya terhadap penyakit kardiovaskuler. Beberapa peneliti melaporkan bahwa antosianin yang dimetabolisme oleh mikroflora usus membentuk metabolit, yang juga bisa berkontribusi terhadap efek kesehatan. parameter yang diamati dalam aterosklerosis, termasuk peradangan, adesi sel, kemotaksis, fungsi endotel, aktivitas estrogenik, anti-estrogenik, dan aktivitas angiotensin-converting enzyme aktivitas (ACE) inhibitor. Dari hasil penelitian efek metabolitnya, hanya asam protocatechuic mempengaruhi produksi NO dan sekresi TNF- $\alpha$  oleh makrofag yang diinduksi dengan LPS-INF- $\gamma$ . Asam galat menyebabkan penurunan sekresi MCP-1, ICAM-1, dan VCAM-1 pada sel endotel. Antosianin menunjukkan memiliki aktivitas inhibitor ACE. Antosianin dan sebagian metabolitnya dapat memberikan efek proteksi terhadap aterosklerosis (Hidalgo *et al.*, 2012).

*Caesalpinia benthamiana* akarnya banyak mengandung senyawa fenolik (asam galat, tanin dan resveratrol). Pemberian ekstrak air *C. benthamiana* diuji efek vasorelaksasinya menggunakan aorta tikus terisolasi. Vasokonstriksi diinduksi dengan pemberian fenilefrin. Ekstrak air *c. benthamiana* mempengaruhi produksi enzim isoform endotel sintase oksida nitrat (eNOS). Aktivitas *scavenging* dinilai terhadap spesies oksigen reaktif (ROS) seperti anion superoksida, Hidrogen peroksida, dan asam hipoklorit (HOCl). Aktivitas ekstrak air *c. benthamiana* pada ROS, juga diuji dengan model fisiopatologi oksidatif dengan menggunakan

neutrofil polimorfonuklear manusia yang dirangsang dengan asetat miristat phorbol. Sifat afrodisiak dari ekstrak air *C. benthamiana* diberikan secara oral dosis 50 mg / kg BB pada tikus jantan dan dievaluasi dengan mengamati perilaku seksual hewan. Hasil penelitian ekstrak air *C. benthamiana* memiliki efek vasorelaksasi yang signifikan pada aorta tikus terisolasi yang diinduksi dengan fenileprin. Ekstrak ini juga mempengaruhi aktivitas radikal kuat terhadap ROS dan merangsang ekspresi mRNA eNOS. Adapun aktivitas afrodisiak dari ekstrak air *C. benthamiana* pada tikus jantan, menunjukkan perangsangan seksual. Selanjutnya, setelah pemberian oral dengan dosis tinggi, ekstrak air *C. benthamiana* tidak menyebabkan kematian atau perubahan perilaku tikus (Zamblé *et al.*, 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh Jang *et al* (2008), terhadap asam galat (GA), asam linoleat (LA), campuran GA dan LA (MGL), dan asam galat-linoleat ester asam (octadeca-9 ,12-dienyl-3 ,4,5-trihydroxybenzoate, Gle) sintesis terhadap hiperlipidemia pada tikus C57BL yang diberi makanan tinggi lemak (MLT). Gle, GA, LA, dan MGL dicampur pada MLT dan komposisi senyawa uji adalah 1% dari MLT selama 7 minggu. Setelah 7 minggu, berat badan rata-rata tikus normal dan kelompok Gle lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang diberi MLT ( $P < 0,05$ ). Berat hati tikus menurun ( $P < 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan relatif terhadap MLT makan kelompok. Lipid plasma seperti trigliserida dan LDL-kolesterol yang ditemukan menurun ( $P < 0,05$ ) di Gle, GA, LA, dan makan MGL tikus bila dibandingkan dengan tikus MLT makan. Tapi high-density lipoprotein (HDL) kolesterol meningkat ( $P < 0,05$ ) pada tikus MLT dan Gle makan bila dibandingkan dengan tikus normal. Akumulasi tetesan lemak



dihati kelompok yang diberi GA, LA, Gle, dan MGL menunjukkan jauh lebih rendah dibandingkan dengan kelompok MLT. Histologi adiposa menunjukkan bahwa suplementasi Gle ditemukan lebih efektif dalam mengurangi ukuran relatif adipocyte dari kelompok perlakuan lainnya. Sebagai kesimpulan, suplementasi Gle sintetik dari asam galat dan ester asam linoleat memiliki efek hipolipidemik pada tikus yang diberi MLT. (Jang *et al.*, 2008)

Penelitian lain melaporkan paparan senyawa 2,29-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ke sel endotel menurun viabilitas sel endotel dari 100% menjadi 43%. Hasil penelitian menunjukan sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak T. sureni (mengandung asam galat) dan dipaparkan AAPH meningkatkan resistensinya terhadap stres oksidatif dan lama hidup sel. Asam galat menekan produksi PGI (2) dan IL-1 oleh sel endotel yang diinduksi AAPH. Khususnya pemberian ekstrak T. sureni dan asam galat signifikan menghambat pembentukan ROS, MDA, aktivitas SOD / katalase, dan disregulasi Bax/Bcl-2 yang induksi dengan AAPH. Sel endotel yang diberi ekstrak T.sureni yang mengandung asam galat menekan ekspresi permukaan dan sekresi, VCAM-1 ICAM-1 dan E-selectin yang diinduksi dengan AAPH, yang berhubungan dengan adhesi leukosit ke sel endotel. Selain itu, ekstrak T.sureni / asam galat signifikan menghambat regulasi PAI-1 dan ke bawah regulasi t-PA yang dimediasi dengan AAPH, dan dapat menurunkan aktivitas fibrinolitik. Disimpulkan T. sinensis mungkin memiliki sifat antioksidan yang dapat melindungi sel-sel endotel dari stres oksidatif. Hasil ini memperkuat penggunaan tradisional sinensis Toona dalam pengobatan penyakit aterosklerosis yang berhubungan dengan stress oksidatif (Yang *et al* 2011).

## 2.12. Tumbuhan Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.)

**2.12.1 Klasifikasi tumbuhan surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.)** (Ali dan Ruslan 1991; Orwa, 2009):

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divis : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Rosida

Ordo : Sapindales

Famili : Meliaceae

Genus : *Toona*

Spesies : *Toona sureni* Merr.

Sinonim : *Cedrela febrifuga* Blume, *Cedrela sureni* (Blume),  
*Toona febrifuga* (Blume) M.J.Roemer. Burkill.

Nama daerah : Suren, surian, surian amba (Sumatera)

## 2.12.2 Morfologi Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.)

Pohon berukuran sedang sampai besar, dapat mencapai tinggi 40 - 60 meter. Diameter batang dapat mencapai 100 cm dan di daerah pegunungan dapat mencapai 300 cm. Kulit batang terlihat pecah-pecah dan seolah tumpang tindih, berwarna coklat keputihan, pucat hingga keabu abuan, dan mengeluarkan aroma khas apabila dipotong. Kayunya ringan, dengan gubal merah muda dan teras coklat. Seperti terlihat gambar 2.12 tangkai mempunyai daun 8 – 30 lembar dengan panjang 10-15cm. Pertulangan daun menyirip dengan anak daun



berpasangan. Permukaan dan tulang daun sebelah atas umumnya berambut. Bunganya kecil berwarna kuning keputihan dan berbau tajam. Biji berwarna coklat dengan panjang 3-6 mm dan lebar 2-4 mm, berbentuk sayap pada salah satu atau kedua ujungnya dan dalam 1 kilogram terdapat sejumlah 64.000 biji. Buah berbentuk kapsul oval, berwarna coklat tua dan terbuka seperti bintang bila matang (Mabberley, 1995; Ali dan Ruslan 1991; Djam'an, 2002; Orwa, 2009).



Gambar 2.12. *Toona sureni* BL. Merr. 1. Habit pohon; 2. Tangkai daun; 3. Bunga; 4. Buah; 5. Biji (Djamaan, 2002).

### 2.12.3. Ekologi dan Penyebaran

Tanaman surian (*Toona sureni* (Blume) merr.) tersebar di Nepal, India, Bhutan, Myanmar, Indo-China, Cina Selatan, Thailand dan sepanjang Malaysia hingga barat Papua Nugini. Di Indonesia, menyebar di Sumatra, Jawa dan Sulawesi yang memiliki rata-rata suhu tahunan 22°C. Jenis surian ini dijumpai di hutan-hutan primer maupun sekunder dan banyak tumbuh di hutan pedesaan, sering ditemukan di sepanjang sungai di daerah bukit dan lereng-lereng, pada ketinggian 1.200 – 2.700 m dpl. Jenis ini memerlukan tanah yang subur (Djam'an,

2002). Tumbuhan Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.) dari famili Meliaceae merupakan jenis pohon berukuran sedang sampai besar dengan tinggi mencapai 40-60 meter, yang memiliki banyak kegunaan (Djam'an, 2002).

#### 2.12.4 Kandungan Kimia dan Bioaktivitas

Akar dan daunnya kaya akan karoten, asam amino dan vitamin. Beberapa bagian pohon, terutama kulit dan akar sering digunakan untuk ramuan obat dalam mengobati diare. Dari hasil penelitian terdahulu diketahui bahwa daun surian mengandung terpenoid yaitu tetranortriterpenoid yaitu surenon dan surenin (Kraus, 1979), steroid dan saponin senyawa flavonoid yaitu kuersetin (Ifmaily 1996), metil galat (Ekaprasada, 2009).

Penapisan senyawa kimia tumbuhan surian menunjukkan adanya golongan senyawa kuinon, tanin katekat, terpenoid, steroid, karotenoid dan fenolik. Dengan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri diketahui bahwa ekstrak etanol mengandung senyawa golongan monoterpen / seskuiterpen, triterpen, kuinon dan senyawa golongan tannin (Cuong 2007). Sedangkan metoda kromatografi gas menunjukkan adanya minyak atsiri yang mengandung 13 komponen. Kromatografi lapis tipis minyak atsiri menunjukkan adanya empat senyawa golongan monoterpen / seskuiterpen. Senyawa hasil isolasi dari daun ini adalah surenon, surenin, surenolakton, lutein,  $\beta$ - sitosterol dan metil galat. (Ali, *et al.*, 1991; Ekaprasada, 2010).

Tanaman surian ini secara tradisional telah digunakan untuk mengembalikan kekuatan ibu-ibu habis melahirkan. Hasil skrining farmakodinamik yang telah dilakukan oleh Fairus 1996 di Fakultas Farmasi menyatakan ekstrak etanol daun suriaan ini memiliki efek penekanan sistim saraf



pusat, parasimpatomimetik, relaksasi otot, dan simpatolitik . Fraksinasi etil asetat daun surian ini terbukti mengandung flavonoid golongan kuersetin dan telah terbukti memiliki efek antioksidan dengan metode pengikatan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Romi, 2009). Ekstrak etanol ekstrak daun surian (*Toona sureni* BL. Merr) dapat memproteksi disfungsi sel endotel pembuluh darah tikus pada keadaan hiperkolesterol dengan meningkatnya kadar NO (Suhatri, 2009).

## **2.13 Ekstraksi dan Fraksinasi**

### **2.13.1. Metode Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan suatu proses penyarian suatu senyawa dari bahan alam khususnya metabolit-metabolit sekunder dengan bantuan pelarut tertentu. Ada beberapa metode yang digunakan untuk penyarian bahan alam. Pemilihan metode dilakukan dengan mempertimbangkan sifat zat yang akan diekstraksi. Pada proses ini dapat digunakan sampel dalam keadaan segar atau yang telah dikeringkan, tergantung pada golongan dan stabilitas senyawa yang akan diisolasi (Departemen Kesehatan, 2000)

Teknik ekstraksi yang sering digunakan dalam menarik senyawa bahan alam diantaranya adalah:

#### **2.13.1.1 Maserasi**

Maserasi merupakan proses penyarian senyawa kimia secara sederhana dengan cara merendam simplisia atau tumbuhan pada suhu kamar dengan menggunakan pelarut yang sesuai sehingga bahan menjadi lunak dan larut. Proses perendaman dilakukan selama 3-5 hari. Ekstraksi dilakukan berulang-ulang kali sehingga sampel terekstraksi secara sempurna yang ditandai dengan pelarut pada sampel berwarna bening

### 2.13.1.2 Fraksinasi

Senyawa-senyawa yang bersifat non-polar akan larut dalam pelarut yang bersifat non-polar sedangkan senyawa-senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga. Berdasarkan hal tersebut dapat dilakukan pemisahan komponen senyawa dengan cara fraksinasi. Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur. Pelarut yang umum dipakai untuk fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat dan butanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non-polar digunakan *n*-heksana, etil asetat untuk menarik senyawa semipolar sedangkan butanol untuk menarik senyawa-senyawa polar.

Tiap-tiap fraksi diuapkan secara *in vacuo* sampai kental dengan *rotary evaporator*. Penguapan dengan menggunakan *rotary evaporator* dipercepat dengan adanya gerakan berputar dari labu rotari sehingga akan memperluas bidang permukaan sampel. Dalam keadaan vakum (*in vacuo*), tekanan uap pelarut akan turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didih normalnya ( Houghton *et al.*, 1998 ).

### 2.13.2 Pemisahan dan Pemurnian

Untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran dapat dilakukan metode kromatografi. Semua metoda kromatografi didasarkan atas pemisahan komponen di antara dua fasa yang tidak bercampur yaitu fasa diam dan fasa gerak. Mekanisme terdistribusinya komponen-komponen yang ada pada kedua fasa itu dapat disebabkan oleh peristiwa adsorpsi, partisi, reaksi penukar ion dan difusi dari komponen ke dalam pori-pori fasa diam. Komponen campuran



akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda akibat hambatan selektif dari fasa diam sehingga terjadi pemisahan.

Sifat utama yang terlibat dalam pemisahan secara kromatografi meliputi antara lain (Gritter *et al.*, 1991; Harbone, 1987):

- a). Kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (berdasarkan kelarutan).
- b). Kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (proses adsorpsi, penyerapan).
- c). Kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap (memiliki sifat keatsirian).

Ada beberapa teknik kromatografi yang dikembangkan antara lain kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi radial, *flash chromatography* dan sebagainya. Pemilihan teknik kromatografi tergantung kepada sifat, jumlah dan kelarutan dari senyawa yang dipisahkan (Perrin, 1980).

Untuk memisahkan senyawa dalam jumlah besar (lebih dari 1 gram) dapat digunakan kromatografi kolom. Fasa diam yang digunakan dapat berupa silika gel, sedangkan fasa geraknya dapat dimulai dari pelarut yang kepolaran ditingkatkan secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya sesuai dengan tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Eluat yang keluar dari kolom kromatografi ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT), fraksi-fraksi yang nilai  $R_f$  sama digabung (Perrin, 1980; Harbone, 1987).

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah suatu teknik pemisahan yang melibatkan fase gerak berupa zat cair dan fase diamnya berupa zat padat atau

cairan yang menutupi permukaan zat padat. Jika sistemnya melibatkan zat cair sebagai fase gerak dan zat padat sebagai fase diam, maka prinsip pemisahannya adalah adsorpsi. Tetapi bila melibatkan cairan yang menutupi permukaan zat padat sebagai fase diam dan fase geraknya tetap cairan, maka prinsip pemisahannya adalah partisi. Dalam prinsip pemisahan secara adsorpsi, jika fase diamnya adalah senyawa polar, maka kromatografi lapis tipisnya disebut fase normal. Bila fase diamnya adalah senyawa non-polar maka disebut fase terbalik (Perrin, 1980; Harbone, 1988).

Dalam kromatografi lapis tipis yang berdasarkan adsorpsi, senyawa-senyawa yang terserap dengan lemah atau tidak terserap sama sekali akan naik lebih cepat. Tetapi bila terserap dengan kuat akan naik lebih lambat.

Kromatografi lapis tipis bisa ditujukan penggunaannya untuk beberapa kepentingan (Perrin, 1980):

- a). untuk menentukan dua senyawa identik atau tidak
- b). untuk menentukan jumlah komponen dalam suatu campuran
- c). untuk menentukan pelarut yang baik dalam pemisahan pada kromatografi kolom
- d). untuk memonitor hasil pemisahan dengan kromatografi kolom
- e). untuk memeriksa apakah hasil pemurnian sudah murni atau belum

Bercak pada plat KLT dapat dideteksi dengan penampak bercak lampu ultraviolet  $\lambda_{254 \text{ nm}}$  atau uap iodium untuk senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor.



Fasa diam yang dapat digunakan sebagai penyerap ada beberapa macam, diantaranya yaitu (Perrin, 1980; Harbone, 1987):

1). Silika Gel

2). Merupakan penyerap yang paling banyak dipakai dan bersifat agak sedikit asam maka asam agak sedikit mudah dipisahkan dengan meminimalkan reaksi asam-basa antara penyerap dan senyawa yang dipisahkan.

3). Alumina

Bersifat sedikit basa dan sering digunakan untuk memisahkan basa dengan meminimumkan reaksi asam-basa.

4). Kieselguhr dan selulosa

5). Merupakan bahan penyangga lapisan zat cair yang dipakai dalam Kromatografi Cair Cair (KCC), digunakan untuk memisahkan senyawa

Polar seperti asam amino, karbohidrat, nukleotida dan berbagai senyawa hidrofil lainnya. Kromatografi radial (chromatotron) merupakan metode pemisahan komponen senyawa kimia dalam jumlah yang sedikit yaitu antara 50-500 mg dan memiliki bercak yang sukar untuk dipisahkan. Prinsip pemisahannya dengan cara memanfaatkan gaya sentrifugal (rotasi) dengan kecepatan gerak 800 rpm, elusi secara kontinu dengan eluen yang cocok dengan kecepatan turunnya pelarut 3-6 ml/menit. Untuk senyawa yang berwarna dan yang tidak berwarna, tetapi dapat menyerap sinar UV dapat dipisahkan dengan alat ini. Suatu perbedaan prinsipil antara chromatotron dengan KLT sentrifugal adalah pada chromatotron, rotor tidak horizontal melainkan miring (Stahl, 1969; Perrin, 1980; Harbone, 1987).

Untuk pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan berat molekul dapat digunakan kromatografi filtrasi dengan menggunakan fasa diam Sephadex LH-20. Sephadex LH-20 dielusi dengan metanol karena metanol memiliki daya pengembang yang bagus untuk molekul-molekul kecil. Senyawa yang memiliki berat molekul yang besar akan terlebih dahulu keluar dari kolom (Harbone, 1987).

Senyawa hasil isolasi jarang didapatkan berupa senyawa murni, biasanya dicemari oleh zat lain selama isolasi. Salah satu cara pemurniannya adalah dengan rekristalisasi, yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat utama yang dimurnikan dengan senyawa minor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran pelarut yang cocok. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang akan dimurnikan. Adanya perbedaan kelarutan akibat pemanasan atau penambahan pelarut lain akan menyebabkan senyawa utama mengkristal lebih dahulu. Proses rekristalisasi ini diulang beberapa kali sehingga didapatkan senyawa berbentuk kristal yang lebih murni yang ditandai dengan jarak lebur yang tajam (Perrin, 1980; Harbone, 1987).

### **2.13.3 Identifikasi dan Karakterisasi**

Metode yang digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi meliputi pemeriksaan organoleptis, reaksi kimia / kualitatif, pemeriksaan KLT, penentuan jarak lebur, penentuan serapan maksimum ultraviolet dan penentuan spektrum inframerah. Pemeriksaan organoleptis suatu senyawa meliputi pemeriksaan bentuk, warna dan bau dari senyawa tersebut. Jika nantinya ditemukan kesulitan dalam menentukan bentuk suatu senyawa (kristal atau amorf), dapat digunakan lup atau mikroskop.



Reaksi kimia terhadap senyawa dilakukan untuk menentukan golongan senyawa. Misalnya senyawa fenolik akan memberikan warna biru hitam dengan  $\text{FeCl}_3$ . Flavonoid akan memberikan warna kuning sampai merah dengan *sianidin test*. Dan senyawa steroid akan memberikan warna hijau dengan Lieberman-Buchard. Untuk melihat kemurnian suatu senyawa dapat dilakukan KLT, dimana senyawa yang murni akan menunjukkan bercak tunggal pada plat KLT. Disamping itu, KLT juga digunakan untuk penentuan harga Rf dari suatu senyawa (Perrin, 1980; Harbone, 1987).

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak relatif yang ditempuh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut pengembang}}$$

Titik lebur adalah suhu pada saat zat mulai melebur. Suhu dari mulai melebur sampai seluruhnya melebur dicatat sebagai jarak lebur. Senyawa yang berupa kristal pada umumnya terdiri dari muatan positif dan negatif yang tersusun dengan teratur. Bila terhadap zat dilakukan pemanasan dengan menaikkan suhu berangsur-angsur, pada suhu tertentu akan melebur. Terjadinya peleburan ini disebabkan karena muatan positif dan negatif itu letaknya tidak teratur lagi. Jarak lebur merupakan sifat fisika yang khas dari senyawa organik.

Pemeriksaan spektrum ultraviolet-visibel dilakukan untuk menentukan jenis kromofor, ikatan rangkap terkonjugasi dan aoksokrom dari suatu senyawa organik, serta menjelaskan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang dari suatu senyawa. Analisa dengan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan kepada pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan

cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mengeksitasi elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi (Perrin, 1980; Harbone, 1987).

Pemeriksaan spektrum inframerah bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi suatu senyawa organik dengan membandingkan daerah sidik jarinya. Pengukuran pada spektrum inframerah dilakukan pada daerah  $666 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Bila sinar inframerah dilewatkan melalui suatu cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi diserap sedangkan frekuensi lain diteruskan / ditransmisikan tanpa diserap. Energi yang dihasilkan oleh radiasi ini akan menyebabkan vibrasi atau getaran pada molekul. Adanya pita-pita yang karakteristik berguna untuk mengetahui gugus-gugus fungsi pada suatu senyawa yang berguna untuk mendapatkan informasi dari struktur dari senyawa yang diteliti (Perrin, 1980; Harbone, 1987).

#### **2.14 Percobaan Pembentukan Aterosklerosis.**

Penginduksian aterosklerosis pada hewan percobaan menunjukkan bervariasi setiap spesies khususnya dalam hal kerentanannya. Kelinci, babi, kera dan manusia merupakan spesies dimana aterosklerosis dapat ditimbulkan dengan makanan yang mengandung kolesterol (Murray, 1997). Tikus, anjing dan kucing merupakan hewan yang resisten terhadap pemberian makanan berkolesterol sehingga aterosklerosis tidak terjadi. Tiroidektomi atau pengobatan dengan preparat tiourasil akan memudahkan timbulnya aterosklerosis pada anjing dan tikus. Karena penggunaan preparat tiourasil dapat menyebabkan berkurangnya tiroksin (hipotiroidisme) dan pada kondisi hipotiroidisme dapat terjadi aterosklerosis (Vogel, 2002; Verbeuren, 2006).



## Beberapa model aterosklerosis pada hewan percobaan yang sering digunakan

### 2.14.1 Kelinci

Kelinci mengalami hiperkolesterolemia dan aterosklerosis setelah diberi makanan yang mengandung lemak tinggi. Oleh karena itu para ilmuwan memilih kelinci untuk studi efek obat-obat yang potensial sebagai anti-aterosklerosis (Moghadasian, 2002).

### 2.14.2 Burung merpati

Aterosklerosis terbentuk secara normal pada merpati yang diberi diet biji-bijian bebas kolesterol. Ada kelompok merpati yang sudah resisten terhadap aterosklerosis yaitu *Show Racer Pigeons*, sedangkan yang masih rentan yaitu kelompok *White Carneau Pigeons*. Selama mengkonsumsi diet bebas kolesterol WC Pigeons akan mengalami aortic aterosklerosis pada umur 3-4 tahun, sedangkan jenis SR Pigeons dengan perlakuan dan umur yang sama tidak menunjukkan hal serupa, akan tetapi hanya 15% SR Pigeons yang berusia 7 tahun yang dapat mengalami aterosklerosis.

### 2.14.3 Burung puyuh (Clair, 1998)

Burung puyuh memiliki kerentanan yang sangat tinggi. Burung puyuh akan membentuk aterosklerosis secara spontan dan meningkat sebanding dengan pemberian makanan berkolesterol, plak aterosklerosis mulai terbentuk, disertai dengan pengerasan intima, nekrosis dan terjadi mineralisasi, yang berhubungan dengan perkembangan aterosklerosis pada manusia. Keuntungan menggunakan burung puyuh sebagai model karena ukurannya yang kecil (120 gram) dan akan

menunjukkan pertumbuhan aterosklerosis aorta setelah 2-3 bulan pemberian makanan berkolesterol.

#### 2.14.4 Mencit

Lebih dari 13 strain mencit dapat digunakan sebagai model untuk penelitian aterosklerosis menyatakan bahwa setelah 14 minggu dalam keadaan diet aterogenik, mencit betina mengalami lesi aterosklerosis pada persimpangan aorta ke jantung dan arteri koronernya. Lesi akan meningkat setelah 9 bulan pemberian diet aterogenik.

#### 2.14.5 Tikus

Tikus hiperkolesterolemia akan mengalami aterosklerosis bila diinduksi dengan penggunaan setiap hari 1 mL/100 gBB koktail yang terdiri dari 1 L minyak kacang, 100 mg kolesterol, 30 g propil tiourasil dan 100 gram asam kolat dengan pemberian lebih dari 60 hari (Vogel, 2002; Verbeuren, 2006).

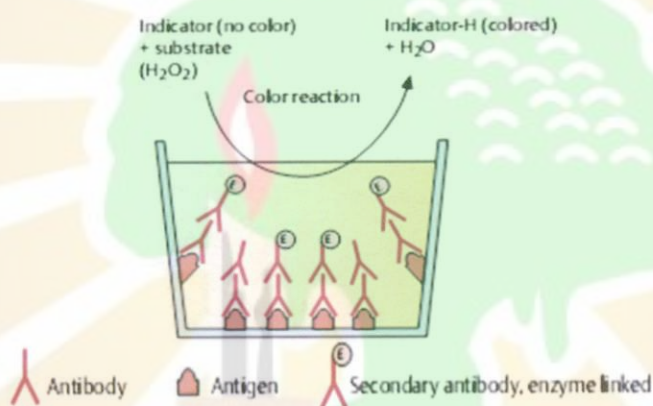
#### 2.14.6 Hamster

Hamster juga rentan terhadap aterosklerosis. memberi makan pada hamster betina dengan makanan yang mengandung diet hiperlipidemia yang terdiri dari makanan standar dan suplemen dengan 3% kolesterol dan 15 % mentega dalam jangka waktu 12 bulan. Serum kolesterol total meningkat 2 kali lipat setelah 3 minggu dan mencapai 17 kali lipat setelah 10 bulan. Setelah lebih dari 6 bulan sel otot polos intima dan media aorta mulai mengandung lipid. Setelah 10 bulan akan terlihat seperti plak aterosklerosis pada manusia dengan penumpukan kolesterol dalam jumlah besar, kalsium dan nekrosis.



## 2.15 Enzyme –Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA merupakan metoda analisis kuantitatif yang pada salah satu reagensinya dilabelkan dengan enzim, baik itu antigen atau antibody (gambar 2.15) Sumur medium pembawa (biasanya plat mikrotiter) dilapisi dengan antigen yang berikatan dengan antibodi sasaran. Antibodi tersebut berada pada sampel (contoh: serum), antibodi ini akan mengikat antigen. Setelah itu, Enzim akan terikat pada antibodi. Enzim yang telah dilabelkan oleh antibodi sekunder tersebut akan menyebabkan warna pada substrat.



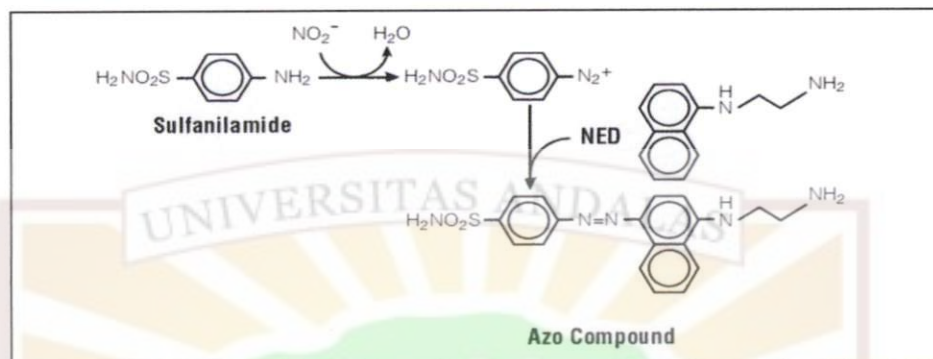
Gambar 2.15. Prinsip *Enzyme–Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Burmester, *et al.*, 2003).

Konsentrasi antibodi dapat ditentukan dengan membandingkan warna yang dihasilkan dengan standar yang telah diketahui konsentrasinya (Burmester, *et al.*, 2003).

### 2.15.1 Pengukuran NO menggunakan reagen GRIESS

NO merupakan gas yang tidak stabil dengan waktu paruh yang pendek sehingga sulit untuk diukur secara langsung. NO dapat diukur dengan menggunakan percobaan GRIESS berdasarkan reaksi diazotasi yang mula-mula diperkenalkan oleh Peter Griess pada tahun 1879.

Konversi Nitrat menjadi Nitrit menggunakan Enzim Nitrat Reduktase. Nitrit dideteksi dari pembentukan warna merah muda akibat reaksi nitrit ditambahkan dengan reagen GRIESS melalui dua langkah.



Gambar 2.16 Reaksi kimia pada pengukuran Nitrit dengan Reagen GRIESS.

Pada saat nitrit ditambahkan sulfanilamide, nitrit membentuk garam diazonium. Dengan penambahan alpha-naphthylamine atau N-(1-naphthyl)-ethylenediamine) akan terbentuk senyawa azo yang berwarna merah muda (gambar 2.16) (Ghasemi *et al.*, 2007).

### 2.15.2 Pengukuran VCAM-1

Prinsip Uji penentuan kadar VCAM-1 berdasarkan immunoenzymatic menggunakan antibodi poliklonal anti-VCAM-1 dan konjugat VCAM-1-HRP. Sampel uji dan buffer diinkubasi bersama dengan konjugat VCAM-1-HRP dalam plat pra-lapis selama satu jam. Setelah diinkubasi sumur didekantasi dan dicuci lima kali. Sumur tersebut kemudian diinkubasi dengan substrat HRP enzim. Hasil reaksi enzim dengan substrat membentuk kompleks berwarna biru. untuk menghentikan reaksi ditambahkan stop solution, yang kemudian akan berubah kuning. Intensitas warna diukur secara spektrofotometri pada 450 nm. Intensitas warna berbanding terbalik dengan konsentrasi-1 VCAM. VCAM-1 dari sampel



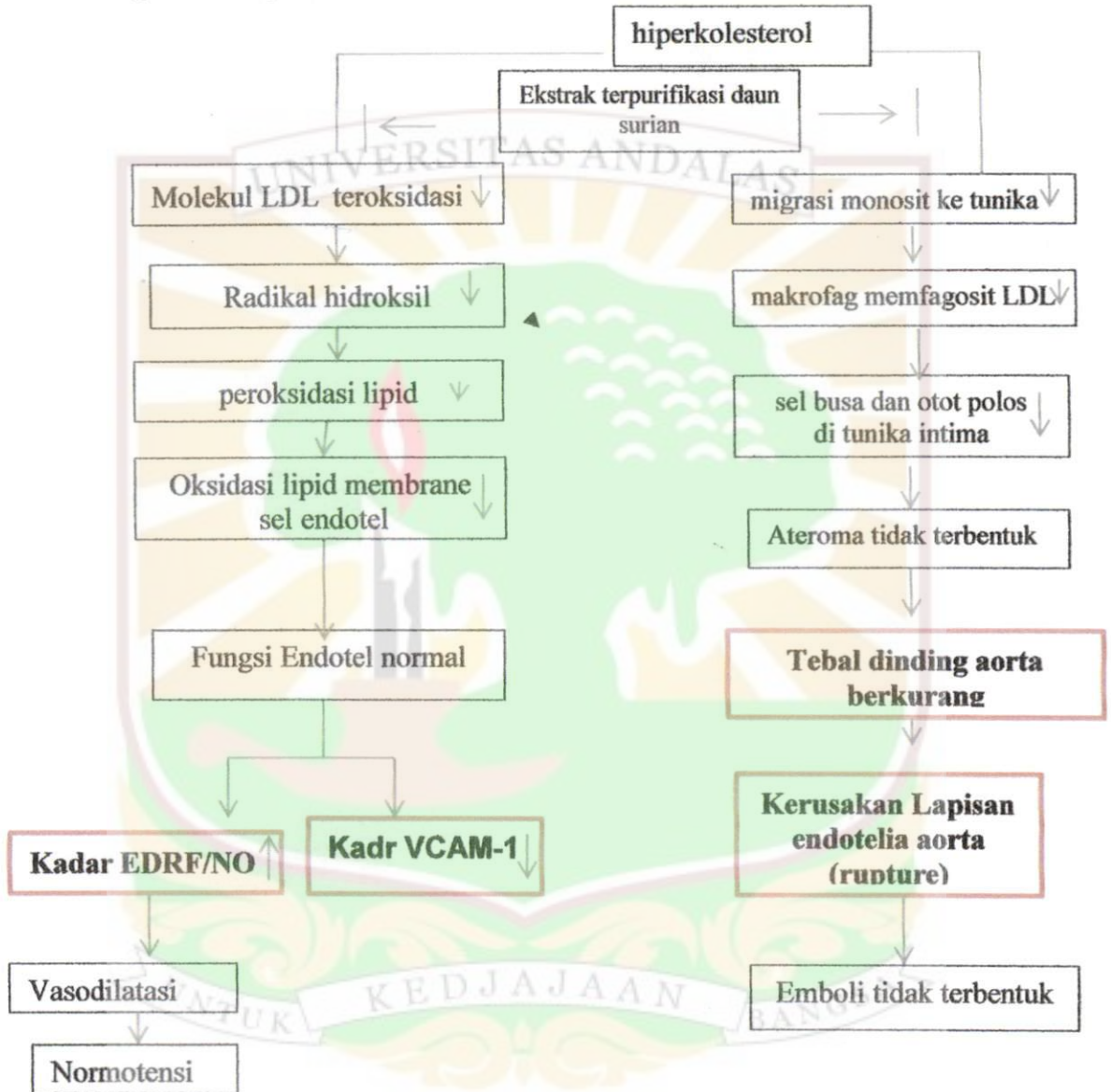
dan VCAM-1-HRP konjugat bersaing pada tempat pengikatan antibodi anti-VCAM-1. Karena jumlah tempat terbatas, tempat lebih banyak ditempati oleh VCAM-1 dari sampel, tempat lebih sedikit yang tersisa untuk mengikat VCAM-1-HRP konjugat. Konsentrasi VCAM-1 diketahui dari kurva Kalibrasi yang dijalankan bersamaan dengan sampel yang diuji dan intensitas warna (OD) dengan konsentrasi VCAM-1 diplot. Konsentrasi VCAM-1 diinterpolasi dari kurva kalibrasi.



### BAB III

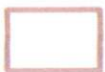
#### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

##### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 : Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan :



= yang diperiksa



## Penjelasan kerangka konseptual

Berdasarkan tinjauan pustaka atas, maka dibuat kerangka konsep sebagai berikut. Peningkatan kadar kholesterol dalam darah (hiperkholesterolemia) dapat menyebabkan kerusakan sel endotelium. Hiperkholesterol dapat menyebabkan molekul *low density lipoprotein* (LDL) mudah teroksidasi, sehingga terbentuk *gugus hidroksil* pada sel endotelium dan otot polos pembuluh darah. *Radikal hidroksil* ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (*polyunsaturated Fatty Acid*) yang merupakan struktur dari membran sel, termasuk sel endotel, sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang akan menghasilkan peroksidasi LDL. LDL teroksidasi dan lipid peroksida yang terbentuk akan merusak sel endotelium pembuluh darah dan lapisan otot polos di bawahnya. sehingga dapat menghambat penglepasan EDRF/ NO (oksida mono nitrat )

*Low density lipoprotein* teroksidasi akan memicu terbentuknya molekul *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)*, *intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)* (Yamamoto., 2008). zat yang dapat melekatkan dan menarik monosit (salah satu jenis sel darah putih) menembus lapisan endotel dan masuk ke dalam intima. Barreiro *et al*, 2002).

Disamping itu LDL-teroksidasi akan difagosit oleh makrofag (monosit yang telah masuk ke dalam intima), dan membentuk sel busa. Sel busa yang terbentuk akan saling berikatan membentuk gumpalan yang makin lama makin besar sehingga membentuk benjolan yang mengakibatkan penyempitan lumen pembuluh darah. Keadaan ini akan semakin memburuk karena makrofag yang memfagosit LDL akan membebaskan faktor pertumbuhan, dan akan merangsang sel-sel otot polos pembuluh darah dalam (media) dan kemudian akan

berproliferasi sehingga jumlahnya semakin banyak dan akan memperkecil diameter pembuluh dan mempertebal dinding pembuluh darah. Penimbunan lipid dalam makrofag dan otot polos pembuluh darah secara makroskopik terlihat sebagai bercak lemak. Deposisi lemak dan jaringan ikat mengubah bercak lemak ini menjadi atheroma lemak matur. Ruptur menyebabkan inti bagian dalam plak terpapar dengan LDL teroksidasi, yang dapat mengalami perdarahan, ulserasi, kalsifikasi dan thrombosis.

Kerusakan sel endotelium ini dapat dihambat oleh preparat antioksidant seperti Vitamin E dan C, dan Probukol. Senyawa polifenol (golongan flavonoid dan metil galat, karotenoid, tannin, peptide, melanoidin, dan asam-asam organik lain (Pratt., 1992). Tanaman surian menurut Sastroamidjoyo mengandung zat pengelat. Kraus melaporkan daun surian mengandung flavonoid (kuersetin) dan metilgalat) dan saponin, berpotensi untuk dikembangkan untuk memperbaiki/ mengembalikan fungsi endotel vaskuler.

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan uraian kerangka konseptual ini dapat dikemukakan hipotesa pada penelitian ini:

1. Ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap sel endotel ditandai dengan meningkatnya kadar EDRF (NO) pada tikus hiperkolesterolemia
2. Ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap sel endotel ditandai dengan meningkatnya kadar *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) pada tikus hiperkolesterolemia



3. Ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap terjadinya penebalan dinding aorta tikus pada keadaan hiperkolesterol.
4. Ada efek proteksi ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kerusakan integritas lapisan endotel aorta tikus pada keadaan hiperkolesterol.



**BAB IV**  
**METODE PENELITIAN**

**4.1 Jenis dan desain penelitian**

Penelitian ini bersifat eksperimental murni, karena semua variabel yang berpengaruh dapat dikendali. Penelitian ini memberi perlakuan pada tikus putih jantan (*Rattus Novergicus* ) sebagai hewan percobaan. Disain penelitian yang dilakukan adalah *post test only control group design*.. Berdasarkan waktu penelitian, penelitian bersifat *cross sectional* karena variabel dependen dan independen diperiksa secara bersamaan.

**4.2 Rancangan Penelitian**





### 4.3 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambil Sampel.

#### 4.3.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus Novergicus*) diperoleh dari unit pemeliharaan hewan percobaan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang memenuhi persyaratan kriteria inklusi dan eksklusif:

##### 4.3.1.1 Kriteria inklusif adalah

- a). Jumlah memenuhi persyaratan jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini.
- b). Sampel berjenis kelamin jantan dengan pertimbangan agar sampel lebih homogen.
- c). Berumur lebih kurang 2 bulan dengan berat badan 180 g s/d 200 g.

##### 4.3.1.2 Kriteria eksklusif adalah

Tikus yang tidak sehat.

#### 4.3.2 Menentukan besar sampel

Untuk menentukan besar sampel (n) dari masing masing kelompok menggunakan rumus besar sampel (n) adalah (Hanafiah, 1997):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan : t = Jumlah kelompok hewan coba

r = Jumlah hewan coba masing-masing kelompok

Penelitian ini diketahui jumlah kelompok hewan coba (t) sebanyak 5 kelompok, maka didapat jumlah hewan coba pada masing-masing kelompok (r) adalah sebagai berikut :

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$r \geq 19 : 4$$

$$r \geq 4,75$$

Jadi sampel untuk setiap kelompok adalah 5 ekor. Total sampel yang diperlukan pada penelitian ini berjumlah 25 ekor.

#### **4.3.3 Teknik pengambilan sampel.**

Tikus yang diambil untuk sampel dalam penelitian ini diambil tikus jantan yang sudah disapih dari induknya sebanyak 25 ekor. Kemudian diberi makanan standar yang cukup vitamin sampai berat badan dan umur memenuhi syarat dalam penelitian ini. Setelah cukup waktu dan berat badan, maka tikus tersebut diaklimatisasi selama seminggu, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak.

### **4.4 Variabel penelitian dan Definisi Operasional Variabel**

#### **4.4.1 Variabel penelitian**

##### **4.4.1.1 Variabel dependen yaitu:**

- a). Kadar NO/ (EDRF)
- b). Kadar Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM)
- c). Keadaan lapisan endotel dinding arteri koroner hewan percobaan yang meliputi Integritas lapisan endotel, diameter lumen, tebal dinding aorta koroner.



#### 4.4.1.2 Variabel independen, yaitu

ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL. Merr).

### 4.4.2 Definisi Operasional Variabel

4.4.2.1 Kadar NO/EDRF adalah kadar NO yang dihasilkan oleh sel endotel pembuluh aorta tikus.

Skala ukur adalah rasio

Metoda ukur adalah ELISA

Hasil ukur adalah mikrogram/dl

4.4.2.2 Kadar VCAM-1 adalah kadar VCAM-1 yang di ditampilkan membran sel endotel aorta tikus.

Skala ukur adalah rasio

Metoda ukur adalah ELISA

Hasil ukur adalah mikrogram/dl

4.4.2.3 Tebal dinding aorta adalah tebal dinding aorta tikus yang diukur pada enam titik yang dapat mewakili tebal dinding aorta secara keseluruhan.

Skala ukur adalah rasio

Alat ukur adalah mikroskop dengan okuler berskala

Hasil ukur adalah mikrometer

4.4.2.4 Lapisan endotel adalah lapisan sel endotel aorta tikus yang dinilai kerusakanya.

Skala ukur adalah ordinal

Alat ukur adalah mikroskop

Hasil ukur adalah derajat kerusakan lapisan endotel yang diberi skor 1 untuk lapisan endotel tikus normal, 2 kerusakan ringan, 3 kerusakan sedang dan 4 kerusakan berat.

#### 4.5 Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian

##### 4.5.1 Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah:

4.5.1.1 Tikus putih (*Rattus Novergicus*).

4.5.1.2 Makanan standar tikus berupa pelet butiran jenis bravo 521 produksi

Charden Pohphand Medan yang mengandung:

- a). Protein 10 – 21 %
- b). Karbohidrat 35 – 40 %
- c). Serat 3 – 5 %
- d). Lemak 5 – 8 %
- e). Mineral 4 – 7 %
- f). Kandungan energi 2.800 – 3.000 kkal/kg

1.5.1.3 Makanan lemak tinggi (MLT) terdiri dari

- a). Kuning telur ayam
- b). Lemak sapi
- c). Propylthiourasil
- d). Daun surian diambil dari kenegarian Talang Kab. Solok
- e). Bahan untuk ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian adalah:
  - 1) Etanol 96 %
  - 2) Heksan
  - 3) Etil asetat
  - 4) KLT (Kromatografi Lapis Tipis)
  - 5) Kromatografi Kolom
  - 6) Silika gel PF 60 ukuran 40-63 nm
- f). Bahan pemeriksaan untuk menentukan kadar nitric oxide diperoleh dari kit *Nitric oxide assay* dari CV. KRISTALINDO BIOLAB Surabaya.
- g). Bahan pemeriksaan untuk menentukan kadar “Vascular cell adhesion



molecule-1 (VCAM)", RayBio® Mouse VCAM-1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

h). Bahan pemeriksaan sedian hispatologi sel endotelia pembuluh aorta adalah:

- 1). Etanol 96 %
- 2). NaCL fisiologis 0,9 %
- 3). Formalin 10 %
- 4). Haemotoxyllin
- 5). Eosin
- 6). Xylol
- 7). Aseton
- 8). Parafin cair
- 9). Parafin padat
- 10). Mayers albumin (campuran putih telur dengan gliserin)
- 11). Perekat entelan
- 12). Air suling

#### 4.5.2 Instrumen Penelitian

##### 4.5.2.1 Alat gelas

Alat gelas sebelumnya telah direndam dengan larutan pencuci kalium bikromat 10 %. selama kurang lebih 24 jam. Setelah direndam gelas-gelas tersebut dicuci dengan air ledeng terakhir dicuci dengan air suling.

##### 4.5.2.2 Timbangan

- a). Timbangan untuk mengukur berat badan tikus, dipakai timbangan Tripel bean merek Fisher scientific made in USA dengan skala terkecil 0,1 gram
- b). Timbangan untuk menimbang bahan-bahan kimia, dipakai timbangan elektronik merek precisa 125 A tipe 300-9213/B buatan Switzerland dengan skala terkecil 0,01  $\mu\text{g}$ .

#### 4.5.2.3 Kandang Tikus.

Kandang tikus yang digunakan terbuat dari bak plastik yang ditutup dengan anyaman kawat dan alasnya diberi sekan. Masing-masing kelompok hewan menempati satu kandang. Sebelum digunakan kandang dicuci bersih, kemudian alasnya diberi sekam. Sekam diganti duakali seminggu sehingga kebersihan hewan percobaan tetap terjaga. Tempat makanan dipakai dari bahan yang terbuat dari plastik. Tempat minuman terbuat dari botol plastik yang dilengkapi dengan tutup jenis termoplastik. Botol diletakan terbalik diatas kandang yang di isi dengan aquades yang diganti tiap hari.

#### 4.5.2.4 Sentrifuge

Dengan *high speed centrifuge* merk Kokusan, model L H. 251 A. Japan

#### 4.5.2.5 Kertas aluminium

4.5.2.6 Dipakai kertas aluminium produksi Lispop Raya Sentosa, Indonesia yang digunakan untuk pelindung terhadap cahaya.

#### 4.5.2.7 Tabung reaksi mikro

Tabung reaksi mikro (*micro test tube*) jenis 3810, dengan isi 1,5 ml made in Republic of Germani.

#### 4.5.2.8 Pipet mikro

Pipet mikro yang digunakan jenis eppendorf research dengan akurasi 10 µl-1000 µl.

#### 4.5.2.9 Alat Elisa

#### 4.5.2.10 Perlengkapan untuk bedah tikus

Digunakan sarung tangan karet, piset, pisau bedah, papan bedah, botol spesimen.



#### 4.5.2.11 Mikrotom

Digunakan mikrotom merek AO (American Optical) untuk memotong pembuluh darah koroner hewan percobaan.

#### 4.6 Persyaratan Etik

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan hewan coba pada penelitian ini mengikuti *Animal Ethic* yang meliputi perawatan dalam kandang, pemberian makan dan minum, aliran udara dalam kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya.

#### 4.7 Pemantapan Mutu

Penelitian ini akan selalu melakukan pemantapan mutu pada semua tahapan guna menjamin ketelitian dan ketepatan hasil pemeriksaan laboratorium. Cakupan objek pemantapan mutu meliputi aktivitas tahap pra-analitik, tahap analitik, dan tahap pasca-analitik. Pemantapan mutu bertujuan untuk memastikan bahwa segala sesuatu sudah dilakukan dengan benar sehingga kevalidan data yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan secara akademis. Sasaran yang menjadi objek kegiatan pemantapan mutu adalah (Yamin, 1999) :

##### 4.7.1 Proses persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba.

Persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan dengan pengontrolan terhadap suhu dan kelembaban, sehingga dapat dipastikan hewan coba mendapatkan lingkungan yang menyenangkan. Makanan dan minuman diberikan sesuai kebutuhan. Dengan demikian dapat dipastikan bahwa semua populasi mendapatkan perlakuan yang sama.

##### 4.7.2 Proses pengambilan, pengiriman, penyimpanan, dan pengolahan spesimen.

Pengambilan spesimen dilakukan oleh tenaga yang sudah terlatih sehingga

dampak terjadinya kerusakan spesimen saat pengambilan dapat dihindarkan atau dikurangi. Proses pengiriman, penyimpanan dan pengolahan spesimen akan dilakukan sesuai dengan prosedur standar.

- 4.7.3 Pengujian terhadap kualitas reagen. Reagen yang diterima akan dilakukan pengecekan terhadap keutuhan segel dan wadah, nomor batch, dan tanggal kadaluarsa.
- 4.7.4 Uji ketelitian dan ketepatan. Khusus untuk setiap alat yang akan digunakan pada pemeriksaan variabel penelitian. Tenaga yang melakukan pemeriksaan laboratorium adalah tenaga teknis labor yang sudah terlatih melakukan pemeriksaan, diharapkan untuk satu jenis pemeriksaan dilakukan oleh satu orang tenaga labor (Mangino L, 1997).
- 4.7.5 Sistem pencatatan dan pelaporan dilakukan dengan benar dan terdokumentasi. Peralatan laboratorium perlu dilakukan kalibrasi. Semua proses pemantapan mutu (*quality assurance*) pada penelitian ini akan mengacu kepada protap yang dikeluarkan oleh Pusat Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

#### **4.8 Lokasi dan Waktu penelitian.**

Penelitian dilakukan di:

- 4.8.1 Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas untuk pemeriksaan kadar NO/EDRF dan VCAM.
- 4.8.2 Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas untuk pembuatan sediaan histologi dan pewarnaan.
- 4.8.3 Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Untuk pemeliharaan dan perlakuan pada hewan percobaan



#### 4.8.4 Laboratorium Kimia bahan Alam Fakultas farmasi Universitas Andalas

Untuk ekstraksi dan fraksinasi dan melakukan kromatografi kolom fraksi etil asetat surian

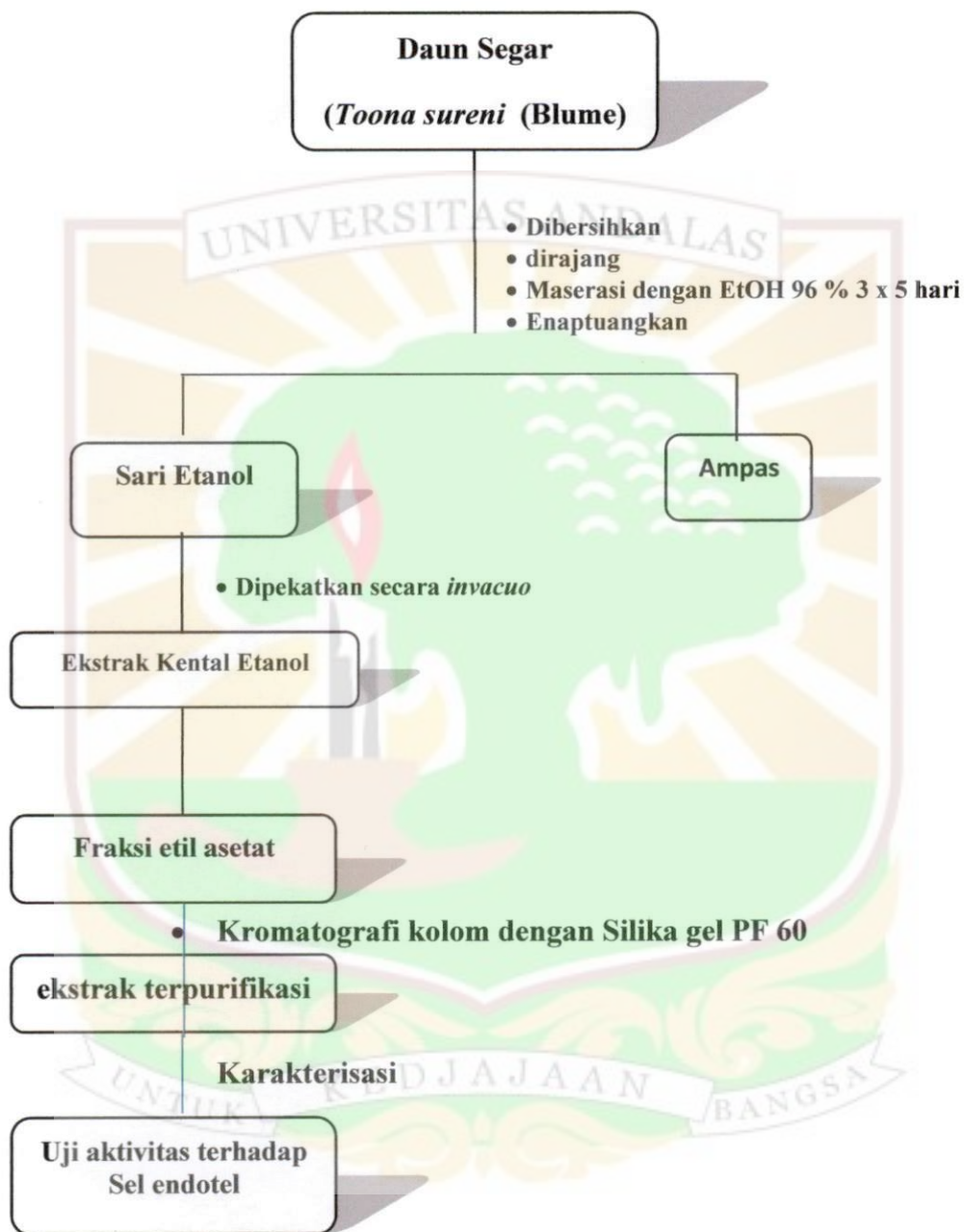
#### **Waktu penelitian:**

Penelitian dilakukan dimulai bulan September 2011 sampai dengan bulan Agustus 2012.



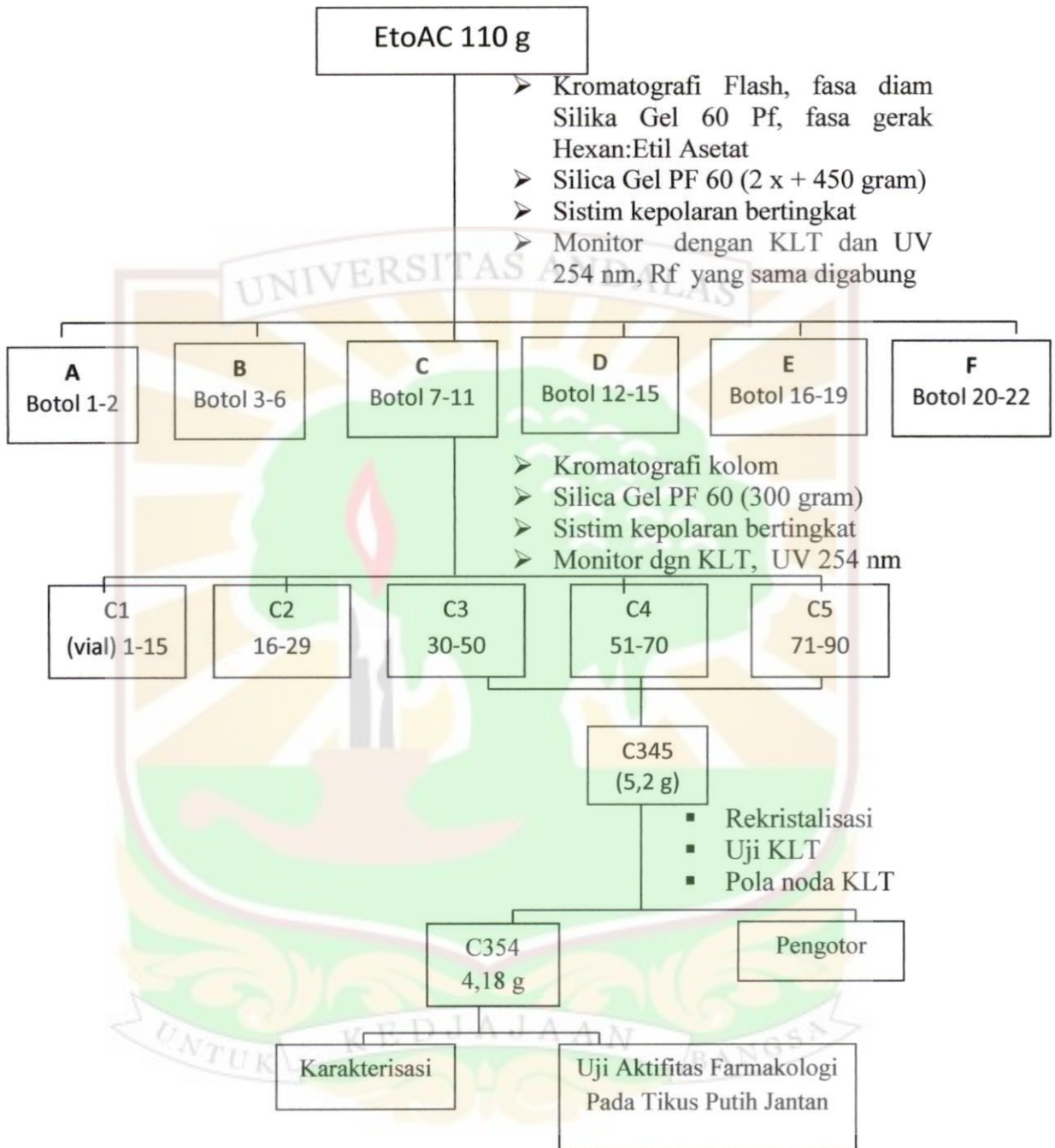
#### 4.9 Prosedur penelitian atau Pengumpulan Data

##### 4.9.1 Kerangka Operasional penelitian proses kromatografi kolom fraksinasi dari Ekstrak Daun Tanaman Daun Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.)

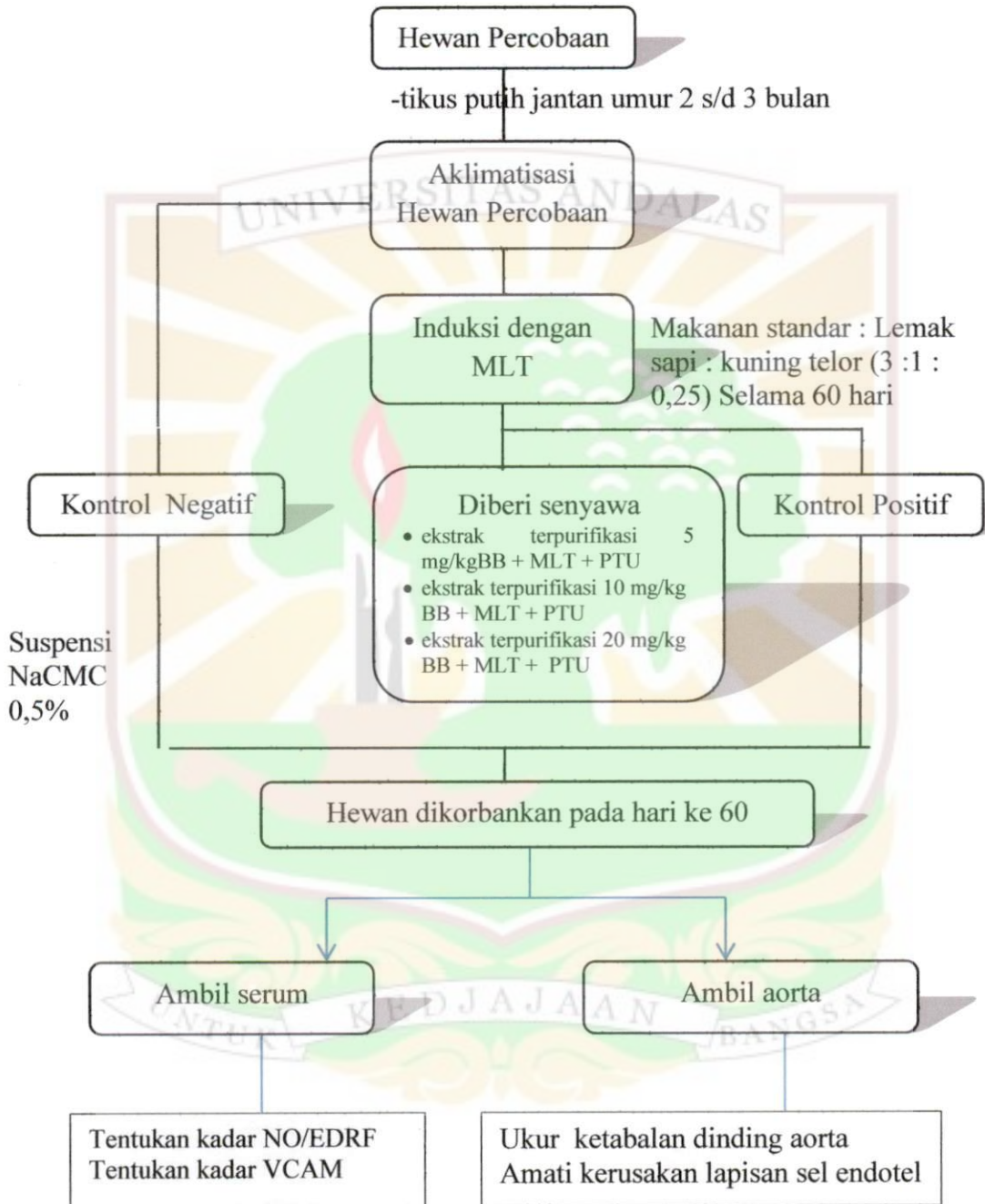




**Skema Kerja Isolasi dan Identifikasi ekstrak terpurifikasi Daun Surian  
(*Toona sureni* BL. Merr)**



**4.9.2. Kerangka Operasional penelitian Skema Kerja Proteksi senyawa Polifenol Daun Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.) terhadap Aterosklerosis**





### 4.9.3 Prosedur penelitian

#### 4.9.3.1 Isolasi dan identifikasi ekstrak terpurifikasi fraksi etil asetat daun surian (*Toona sureni* (Blume) Merr).

Fraksi etil asetat dari daun surian sebanyak 10 g dikromatografi kolom menggunakan fasa diam Silika gel PF 60 ukuran 40-63  $\mu\text{m}$  dan fasa geraknya kombinasi pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol yang ditingkatkan kepolarannya dengan berbagai perbandingan (*Step Gradien Polarity*). Silika gel PF 60 disuspensikan dengan *n*-heksan dan diaduk homogen. Suspensi Silika gel PF 60 ini dimasukkan ke dalam kolom berupa tabung kaca yang ujungnya telah diberi kapas. Silika gel PF 60 di dalam kolom dipadatkan sehingga tidak ada rongga udara. Sampel disiapkan secara preadsorpsi dengan melarutkannya dalam etil asetat kemudian ditambahkan Silika gel PF 60 sama banyak (10 g) dan pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh sampel kering berupa serbuk yang dapat dikerok dengan spatel. Sampel yang telah digerus homogen ditaburkan merata ke dalam kolom kemudian dielusi dengan komposisi eluen sebagai berikut :

<i>n</i> -heksana 100 %	150 ml
<i>n</i> -heksana / etil asetat 9: 1	100 ml
<i>n</i> -heksana / etil asetat 4: 1	250 ml
<i>n</i> -heksana / etil asetat 2: 1	500 ml
<i>n</i> -heksana / etil asetat 1: 1	400 ml
etil asetat 100 %	200 ml
etil asetat / metanol 9:1	500 ml
etil asetat / metanol 4:1	100 ml
etil asetat / metanol 2:1	200 ml

etil asetat / metanol	1:1	500 ml
metanol 100 %		350 ml

Fraksi yang keluar ditampung dalam vial @ 20 ml. Tiap fraksi dimonitor dengan KLT menggunakan fasa diam plat silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase geraknya kombinasi pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol dengan berbagai tingkat kepolaran. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV<sub>254 nm</sub> untuk senyawa-senyawa yang mengandung gugus kromofor, uap iodine untuk senyawa-senyawa yang tidak mengandung gugus kromofor karena bercak dari senyawa tersebut tidak tampak di bawah lampu UV<sub>254 nm</sub> serta FeCl<sub>3</sub> untuk mendeteksi senyawa flavonoid dan fenolik. Fraksi dengan pola KLT yang sama digabung sehingga diperoleh beberapa fraksi. Kemudian masing-masing fraksi ditentukan beratnya.

#### 4.9.3.2 Karakterisasi Ekstrak terpurifikasi Daun Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr).

##### a). Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan bentuk, bau dan warna

##### b). Pemeriksaan Kimia (Departemen Kesehatan RI. 2000)

Pemeriksaan ini dilakukan dengan mereaksikan senyawa hasil isolasi dengan pereaksi tertentu yang menunjukkan golongan senyawa kimia utama seperti FeCl<sub>3</sub> untuk golongan fenolik dan flavonoid, Mg/HCl untuk golongan flavonoid dan Lieberman-Burchard untuk terpen/steroid.

##### c). Penentuan Jarak Lebur (Departemen Kesehatan RI. 2000.)

Dilakukan dengan menggunakan alat ukur jarak lebur *Fischer Jhons*



*Melting Points Apparatus*. Beberapa butir senyawa diletakkan di antara dua kaca objek, kemudian diletakkan di atas pemanas di bawah kaca pembesar dan diatur kenaikan suhunya. Kemudian diamati perubahan fisik sejak awal melebur sampai melebur sempurna, sehingga diperoleh jarak lebur senyawa. Senyawa yang murni biasanya mempunyai jarak lebur yang tajam dengan selisih  $1^{\circ}\text{C}$  sampai dengan  $2^{\circ}\text{C}$ .

d). Pemeriksaan KLT dan pemeriksaan kemurnian (Stahl, 1969; Gritter, 1991)

Pemeriksaan KLT dilakukan untuk menunjukkan kemurnian senyawa dan penentuan  $R_f$  senyawa hasil isolasi dengan fasa gerak yang sesuai. Sebagai penampak bercak, digunakan lampu  $\text{UV}_{254\text{ nm}}$  dan  $\text{UV}_{366\text{ nm}}$  untuk senyawa yang tidak mempunyai gugus kromofor (tidak terlihat di bawah UV), pemeriksaan kemurnian dilakukan dengan menggunakan reagen penampak bercak yang disemprotkan pada plat KLT seperti uap iodin, Lieberman Burchard dan vanilin asam sulfat.

Untuk meningkatkan intensitas warna yang diamati dapat dilakukan dengan pemanasan plat KLT. Pemeriksaan kemurnian ditegaskan dengan *Multiple Developing System* pada plat KLT, dielusi dengan beberapa kali tahap (siklus) dengan eluen yang sama. Setiap kali pengelusian, plat KLT dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan tahap pengelusian berikutnya sampai lima kali. Masing-masing berkas bercak pada tiap tahap pengelusian ditandai dengan garis putus-putus.

e). Hidrolisis Senyawa Flavonoid (Markham, 1988)

Senyawa yang diduga flavonoid, dihidrolisis sebanyak 1 mg dengan melarutkan flavonoid ke dalam metanol dan HCl 4 N (1:1) sebanyak 2 ml dan dipanaskan di atas *waterbath* selama 2 jam. Kemudian diuapkan sampai kering. Sisa penguapan diekstraksi dengan etil asetat dan air, masing-masing fraksi dipisahkan. Fraksi etil asetat diuapkan sampai kering dan dilarutkan dengan sedikit metanol kemudian dikromatografi dengan plat KLT selulosa dan pengembang asam asetat 15 %, penampak bercak sitroborat.

f). Penentuan Fisikokimia (Crews, 1998)

1). Penentuan Spektrum Ultraviolet.

Pemeriksaan spektrum UV dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-visibel. Senyawa aktif hasil isolasi sebanyak 1 mg dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian diukur serapannya. Konsentrasi diatur sehingga nantinya senyawa memberikan serapan dibawah 1,00

2). Penentuan Spektrum Inframerah

Pemeriksaan spektrum inframerah dilakukan dengan *Spectrum One FTIR Spectrometer* (Perkin Elmer®). Senyawa hasil isolasi sebanyak 1 mg digerus homogen dengan 100 mg KBr, campuran kemudian dikempa dengan kekuatan 10 ton/cm<sup>2</sup> sehingga terbentuk sebuah pelet tipis dan transparan, kemudian diukur serapannya.



#### 4.9.3.3. Penetapan kadar metil galat dalam sub fraksi etil asetat Daun Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr).

a). Pembuatan Larutan polifenol Daun Surian 500 ppm.

Sub fraksi etil asetat daun surian (*Toona sureni* (Blume) Merr). Digerus homogen kemudian ditimbang seksama sejumlah kurang lebih 10 mg, dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, dilarutkan 50 ml metanol pa. Pipet 1 ml dan diencerkan dengan metanol pa sampai 25 ml. Larutan disaring dengan penyaring milipore 0,45  $\mu\text{m}$ . Sehingga diperoleh kosentrasi 500 ppm. Larutan siap untuk diinjeksikan kedalam kromatograf.

b). Pembuatan Larutan Standar metil galat (100 ppm)

Ditimbang seksama lebih kurang 5 mg standar metil galat. Dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml. dilarutkan dengan methanol pa 50 ml. Standar ini dapat diencerkan sesuai kosentrasi yang diinginkan untuk pembuatan kurva kalibrasi. Filtrat disaring dengan penyaring milipore 0,45 $\mu\text{m}$ . Larutan siap untuk diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi.

c). Prosedur penetapan kadar ekstrak terpurifikasi.

Larutan ekstrak terpurifikasi dan larutan standar masing-masing disuntikkan secara terpisah dan dilakukan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kondisi yang sama meliputi ukuran dan panjang kolom, fasa diam detektor uv pada panjang gelombang 271nm, fase gerak campuran metanol : air, laju aliran, program *gradient polarity* dan volume penyuntikan yang sama yang didapat pada uji kesesuaian sistem. Larutan diinjeksi dengan volume injeksi 20  $\mu\text{l}$  kedalam sistem KCKT. Identifikasi ditentukan dengan membandingkan waktu retensi dari puncak-puncak utama pada masing-masing kromatogram dari larutan uji dengan kromatogram larutan standar. Liniritas dilakukan dengan analisa seri larutan

standar metil galat (empat seri kosentrasi) dan diinjeksikan pada alat KCKT dengan menggunakan loop 20ul. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot luas area yang didapat dari analisa terhadap kosentrasi standar. Liniritas ditentukan oleh harga  $r$  (koefisien korelasi).

#### 4.9.3.3 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan adalah tikus putih betina galur Wistar dengan bobot badan 200-250 gram. Hewan ini diaklimatisasikan dengan lingkungan percobaan selama lebih kurang seminggu dengan menimbang berat badannya setiap hari, mengamati tingkah lakunya dan memberinya makanan dan minuman yang sama. Tikus yang digunakan adalah tikus yang sehat dan selama aklimatisasi berat badannya tidak berubah lebih dari 10%. Tikus ini dibagi atas 6 kelompok, masing-masing kelompok hewan diberi ekstrak sesuai dengan rancangan percobaan ((Departemen Kesehatan RI, 1979).

#### 4.9.3.4 Penyiapan Makanan Lemak Tinggi (MLT).

MLT terdiri dari makanan standar, lemak sapi dan kuning telur ( 3: 1: 0,25) (Vogel,2002). MLT dibuat dengan cara sebagai berikut: panaskan lemak sapi tambahkan kuning telur aduk homogen, dan dicampur dengan makanan standar.

#### 4.9.3.5 Penyiapan Suspensi (Dosis) ekstrak terpurifikasi Daun Surian (*Toona Sureni* BL.Merr)

Sediaan uji dibuat dengan mensuspensikan ekstrak terpurifikasi *T. sureni* dengan NaCMC 0,5%. Pembuatan suspensi dengan cara menimbang NaCMC sebanyak 500 mg ditaburkan diatas air panas dalam lumpang panas sebanyak 20 kalinya yaitu 20 mL lalu dibiarkan sampai mengembang kemudian digerus



ditambahkan ekstrak terpurifikasi *T. sureni* yang telah ditimbang sesuai dosis yang diberikan dan digerus homogen kemudian tambahkan sisa air sampai volume yang dibutuhkan, sehingga diperoleh sedian uji dengan konsentrasi 0,4%, 0,8 %, 1,6 % dan siap diberikan pada hewan percobaan, Volume sedian uji yang diberikan kepada hewan percobaan dihitung berdasarkan rumus volume administrasi (VAO).

Rumus VAO adalah.

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Dosis (gram/BB (kg))}}{\text{VAO g/100 ml}} \times \text{Berat badan (kg)}$$

#### 4.9.3.6 Penyiapan Suspensi Propilthiouracyl

Pembuatanya sama dengan pembuatan suspensi ekstrak terpurifikasi daun surian. Dosis yang digunakan adalah 14mg /kg BB, konsentrasi yang dibuat adalah 3 %. Volume yang diberikan adalah 0,5 ml/200 g tikus.

#### 4.9.3.7 Penentuan Kadar Kolesterol, NO/EDRF dan VCAM-1 dan Keadaan Lapisan Endotelium dan Dinding Pembuluh Aorta.

Setelah tikus diaklimatisasi, tikus dibagi menjadi 15 kelompok (setiap kelompok terdiri dari 6 ekor). Tikus diberikan MLT secara peroral dengan volume pemberian 2% BB selama 7 hari dan pemberian MLT diteruskan bersama ekstrak terpurifikasi selama 60 hari sesuai dengan rancangan percobaan. Pada akhir percobaan masing-masing kelompok tikus diambil darahnya melalui pembuluh darah leher. Darah yang diperoleh dibiarkan 15 menit kemudian disentrifuga

dengan kecepatan 3000 rpm . serumnya diambil dan di simpan di dalam freezer untuk ditentukan kadar NO/EDRF dan VCAM-1.

#### A). Penentuan Kadar Kolesterol

Serum dipipet sebanyak 0,01 ml ditambah larutan pereaksi kolesterol sebanyak 1 ml dicampur dengan vortex, dan biarkan pada suhu kamar selama 20 menit. Ukur pada panjang gelombang 500 nm. Sebagai blanko digunakan pereaksi kolesterol 1 ml dan aquades 0,01 ml. pengukuran serapan sampel sama dengan pengukuran serapan standar. Serum darah sampel diganti dengan standar kolesterol.

Kadar kolesterol total dihitung dengan rumus sebagai berikut (Kaplan, 1979).

$$\text{Kadar kolesterol mg/dl} = \frac{\text{Absorpsi sampel}}{\text{Absorpsi standar}} \times \text{kadar kolesterol standar}$$

#### B). Penentuan Kadar NO/EDRF (Ghasemi *et al.*, 2007 )

Pemeriksaan kadar NO serum dilakukan dengan menggunakan Kit *Assay Designs<sup>TM</sup> Total Nitric Oxide Assay* produksi *Stressgen* dan alat *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) produksi Bio-Rad. Jumlah sumur pada plat mikrotiter yang digunakan setiap percobaan adalah sebanyak 26 buah yang terdiri dari 7 sumur standar, 1 sumur blanko dan 18 sumur sampel.

Pemeriksaan kadar NO serum dengan cara pipet 200  $\mu\text{L}$  *Reaction Buffer* (RB) ke dalam sumur blanko. Ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  standar ke sumur A1-G1. Ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  RB ke dalam sumur standar (sumur A1-G1). Pipet 50  $\mu\text{L}$  sampel serum ke masing-masing sumur sampel. Selanjutnya ditambahkan 25  $\mu\text{L}$



*Final NADH dilution* ke sumur standar dan sampel. Ditambahkan 25  $\mu\text{L}$  Nitrat reduktase *Final Enzyme dilution* ke sumur standar dan sampel, kemudian dicampur dan ditutup plat mikrotiter. Diinkubasi selama 30 menit pada 37°C. Selanjutnya ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  *Reagen Griess I* ke setiap sumur, kecuali sumur blanko. Ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  *Reagen Griess II* ke setiap sumur, kecuali sumur blanko. Kemudian dicampur merata. Diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit, dan dimasukkan plat ke dalam alat ELISA. Optikal Densiti setiap sumur Pemeriksaan kadar NO serum dilakukan dengan menggunakan Kit *Assay Designs<sup>TM</sup> Total Nitric Oxide Assay* produksi *Stressgen* dan alat *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) produksi Bio-Rad. Jumlah sumur pada plat mikrotiter yang digunakan sebanyak 26 buah yang terdiri dari 7 sumur standar, 1 sumur blanko dan 18 sumur sampel.

Pemeriksaan kadar NO serum dengan cara pipet 200  $\mu\text{L}$  *Reaction Buffer* (RB) ke dalam sumur blanko. Tambahkan 50  $\mu\text{L}$  standar ke sumur A1-G1. Tambahkan 50  $\mu\text{L}$  RB ke dalam sumur standar (sumur A1-G1). Pipet 50  $\mu\text{L}$  sampel serum ke masing-masing sumur sampel. Tambahkan 25  $\mu\text{L}$  *Final NADH dilution* ke sumur standar dan sampel. Tambahkan 25  $\mu\text{L}$  Nitrat reduktase *Final Enzyme dilution* ke sumur standar dan sampel. Campur dan tutup plat mikrotiter. Inkubasi selama 30 menit pada 37°C. Pipet 50  $\mu\text{L}$  *Reagen Griess I* ke setiap sumur, kecuali sumur blanko. Pipet 50  $\mu\text{L}$  *Reagen Griess II* ke setiap sumur, kecuali sumur blanko. Campur merata. Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Masukkan plat ke dalam alat ELISA, Optikal Densiti setiap sumur ukur pada  $\lambda$  550 nm.

## Perhitungan

Ada beberapa pilihan untuk menghitung konsentrasi NO total dalam sampel hitung loncatan *optical density* (OD) rata-rata untuk setiap ikatan standar dan sampel dengan substrat. Rata-rata OD standar OD dan rata-rata OD setiap standar dan sampel.

$$\text{Rata-rata net OD} = \text{rata-rata OD} - \text{rata-rata OD standar}$$

- 1). Plot rata-rata net OD setiap konsentrasi standar.
- 2). Plot rata-rata OD untuk setiap konsentrasi sampel dan ekstrapolasi konsentrasi NO total dari grafik.

## C). Penentuan Kadar VCAM-1.

### Prosedur:

- 1). letakan reagen dan sampel pada suhu kamar (18 - 25°C) sebelum digunakan. Dianjurkan standar dan sampel di run bersamaan/ duplikasi.
- 2). Tambahkan 100 µl setiap sumur standar (reagen preparat tahap 2) dan sampel kedalam sumur yang sesuai. Tutup sumur dan di inkubasi selama 2,5 jam pada temperatur ruangan atau lebih satu malam pada suhu 4°C dengan pengocokan lembut (with gentle shaking).
- 3). Pisahkan larutan dan bilas 4 x dengan larutan pencuci. Cuci masing-masing sumur dengan memasukan buffer pencuci 300 µl dengan menggunakan pipet multi chanel atau pencuci otomatis. Pada setiap langkah cairan dihilangkan dengan sempurna, dan penting untuk performan yang baik. Setelah pencucian terakhir hilangkan bufer sis pencuci dengan aspirasi atau dekantasi. Invert the plate dibalikan dan blot lagi dengan tisu pembersih



- 4). Tambahkan 100  $\mu$ l 1x preparat antibodi terbiotinilasi (reagen Preparation step tiga pada masing-masing sumur. Incubasi selama 1 jam pada suhu ruangan dengan mengocok secara perlahan.
- 5). Pisahkan larutan. Ulangi pencucian seperti tahap 3.
- 6). Tambahkan 100  $\mu$ l preparat larutan Streptavidin (reagen Preparation step 4 pada masing-masing sumur. Inkubasi selama 45 menit pada temperatur ruangan dengan mengocok secara perlahan.
- 7). Pisahkan larutan. Ulangi pencucian seperti tahap 3.
- 8). Tambahkan 100  $\mu$ l of TMB Reagen Substrat Step 1 (Item H) pada masing-masing sumur inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan terlindung cahaya/ gelap dengan mengocok secara perlahan.
- 9). Tambahkan 50  $\mu$ l larutan penghenti (Item I) pada masing-masing sumur.  
Baca pada panjang 450 nm.

#### **D). Pemeriksaan Keadaan lapisan Endotelium Dinding Pembuluh Aorta.**

Tikus yang telah diperlakukan dibedah untuk diambil organ jantungnya. Organ jantung difiksasi dengan larutan formalin bufer 10 % selama 24 jam. Selajutnya didehidrasi secara berurutan dengan aseton sebanyak 3 x. Seterusnya lakukan proses embeding dengan xylol I selama 1 jam dan dilanjutkan dengan xilol II selama 2 jam. Kemudian di infiltrasi ke parafin cair dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 56 ° C – 60 ° C. Lakukan proses embeding yaitu menanam jaringan ke parafin. Jaringan yang telah diblok dengan parafin, kemudian dipotong dengan menggunakan *Rotary microtom* dengan ketebalan 3  $\mu$ m – 5  $\mu$ m. Preparat diletakan pada *waterbath* yang berisi air dan dipanaskan pada suhu 56 ° C – 60 ° C. Potongan jaringan berbentuk pita diletakan pada gelas objek yang

sebelumnya diberi perekat putih telur dan glyserin, selanjutnya dimasukan ke dalam *oven slide*. Dinginkan sebentar sebelum dilakuakn proses pewarnaan. Sayatan jantung yang ada pada kaca objek ini dikering anginkan. Dan dilanjutkan dengan proses pewarnaan.

#### **E). Pewarnaan Preparat dengan Zat Warna Haematoxyllin-Eosin (Lesson: 1989)**

Sayatan jantung yang ada pada kaca objek, dideparafinasi dengan xylol I selama 5 menit dan xylol II selama selama 5 menit juga. Selanjut di dehidrasi secara berurutan dengan alkohol 96 % sebanyak 3 kali, masing-masing selama 2 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir atau air kran selama 2 menit dan selanjutnya dikeringkan. Lakukan pewarnaan dengan Mayer haematoxyllin selama 5 menit. Seterusnya cuci dengan air mengalir selam 2 menit. Preparat ini dimasukan ke dalam larutan HCL 0,4 % sebanyak 2 – 3 celup dan seterusnya cuci dengan air mengalir atau air kran selama 2 menit – 5 menit. Kemudian preparat ini di warnai dengan eosin selama 1 menit – 15 menit. Selanjutnya di dehidrasi kembali dengan alkohol 96 % sebanyak 3 kali, masing-masing selama 2 menit. Preparat di clearing dengan xylol I selama 5 menit dan xylol II selama selama 5 menit juga, kemudian keringkan dengan tisu. Lakukan proses mounting dengan memberikan perekat etellan pada preparat dan menutupnya dengan objek glass. Kelebihan perekat dihilangkan dengan kain lap atau tisu dan preparat siap untuk diamati dibawah mikroskop.

#### **F). Pengukuran Tebal Dinding dan keadaan Lapisan Sel Endotel Aorta dengan Menggunakan Mikrometer.**

##### **1). Tebal Dinding Aorta**

Tebal dinding aorta diukur pada 6 titik yang dapat mewakili tebal



dinding aorta secara keseluruhan kemudian dirata-ratakan.

## **2). Penelaian Kerusakan Sel Endotel dan Otot polos Aorta**

Penilaian di lakukan dengan mengamati kerusakan pada sel endotelia dan juga terjadi atau tidak terjadi proliferasi sel otot polos aorta. Kemudian diberi skor sesuai dengan tingkat keparahnya. Skor 1 diberikan pada hewan normal, skor 2 untuk tingkat keparahan ringan, skor 3 tingkat keparahan sedang dan skor 4 untuk tingkat keparahan berat, kemudian dihitung jumlah rata-rata skor tiap perlakuan.

### **4.10. Analisa data**

Data kadar NO/EDRF, VCAM-1 dan tebal dinding aorta endotelia dianalisa dengan ANOVA 1 arah. Kemudian dilanjutkan dengan Bonferroni. Kebermaknaan diambil pada  $P < 0,05$ . Kerusakan sel endotel dianalis dengan Kruskal-Wallis (Dahlan, 2004).

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

#### 5.10 Hasil Pemeriksaan Ekstrak terpurifikasi Daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)

Dari 4 kg daun surian *Toona sureni* BL Merr segar diperoleh ekstrak kental etanol sebanyak 351,3 g (8,782%), dari 351,3 g ekstrak kental etanol daun surian diperoleh fraksi Etil Asetat sebanyak 118,69 g (2,97%).(Lampiran 2). Dari 110 g fraksi Etil Asetat diperoleh senyawa hasil isolasi sebanyak 4,18 g (3,805%).(Lampiran 3).

Hasil pemeriksaan Metabolit sekunder dari fraksi etil asetat *Toona sureni* (BL) Merr terbukti fraksi ini positif mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, saponin, fenolik (tabel 5. 1, lampiran 5 Gambar 3).

Tabel 5.1. Hasil Pemeriksaan Metabolit Sekunder Fraksi Etil Asetat Daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)

Metabolit Sekunder	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
Alkaloid	Mayer	tidak terbentuk endapan putih	( - )
Flavonoid	Sianidin test	terbentuk larutan orange merah	( + )
Terpenoid	Liberman-Bourchat	terbentuk larutan biru	( + )
Steroid	Liberman-Bourchat	terbentuk larutan ungu	( + )
Saponin	Air	terbentuk bua	( + )
Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	biru/ungu	( + )

Ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni* BL Merr) berbentuk serbuk amorf berwarna putih kehijauan, bau khas, rasa pahit memiliki titik leleh 180-183<sup>0</sup> C. Pada pola noda pada plat KLT memberikan Rf 0,56 dan asam galat Rf nya 0,53 yang diamati pada plat KLT silika gel PF 254 dengan eluen N-hexan:Etil asetat (6:4).



Tabel 5.2. Pemeriksaan Ekstrak terpurifikasi Daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)

Pemeriksaan	Ekstrak terpurifikasi
1. Organoleptis	
Bentuk	serbuk
Warna	putih kehijauan
Bau	khas
Rasa	pahit
2. Jarak titik leleh	180° C-183° C
3. Nilai Rf KLT	0,56
4. Spektrum UV	$\lambda$ 271 nm (MeOH)

Seperti tercantum dalam tabel 5.2 diatas, hasil pemeriksaan ekstrak terpurifikasi *T.sureni* secara spektrofotometri UV-Vis memiliki panjang gelombang maksimal ( $\lambda$  max) pada 271 nm, absorban 0,56. (seperti terlihat pada lampiran 5 gambar 3). Asam galat standar memiliki panjang gelombang maksimal ( $\lambda$  max) pada dan 275 nm.

Hasil analisis spektrum FTIR ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni* BL Merr) seperti terlihat pada lampiran 5 gambar 5 memiliki serapan ulur pada daerah bilang gelombang 3414 (O-H); 2933 (C-H); 1693 (C=O); 1619 (C=C cincin benzen); sangat mendekati spektrum IR asam galat seperti spectrum IR asam galat seperti terlihat pada lampiran 5 gambar 5 dan gambar 6.

Hasil pemeriksaan HPLC ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni* BL Merr), seperti terlihat dari lampiran 5 gambar 7, memiliki 2 puncak dengan waktu retensi 2,99 dan 3,27. Salah satu puncak yang muncul ini sama dengan puncak yang diberikan oleh asam galat seperti terlihat pada lampiran 5 dan Gambar 7 dan gambar 8.

Kadar asam galat yang terdapat dalam subfraksi etil asetat adalah 50,3 % ( lampiran 5 tabel 1 dan gambar 9)

5.2 Hasil Pengamatan Kadar Kolesterol Serum

Tabel 5.3 Kadar Kolesterol Total Serum Tikus setelah Pemberian Ekstrak Terpurifikasi Daun Surian (*Toona Sureni* BL Merr)

No Hewan	kadar kolesterol dalam serum (mg/dl)				
	kontrol positif	kontrol negative	5 mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	95.33	79.62	72.18	80.90	89.32
2	95.39	78.78	83.02	80.32	87.88
3	100.84	60.35	72.33	85.30	84.69
4	104.03	65.43	88.71	91.36	72.03
5	91.06	73,61	83.55	83.02	93.49
Rata-rata ± SD	97,33 ± 5,11	71,56 ± 8,43	79,96 ± 3,7	84,18 ± 1,99	85,48 ± 8,16

Tabel 5.4 Kebermaknaan Hasil Pengukuran Kadar Kolesterol dengan Analisa statistik Bonferroni

	Kontrol (-)	Kontrol (+)	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol (-)	ns	0,00 <sup>s</sup>	0,741 <sup>(ns)</sup>	0,103 <sup>(ns)</sup>	0,053 <sup>(ns)</sup>
Kontrol (+)	0,000 <sup>s</sup>	ns	0,006 <sup>s</sup>	0,053 <sup>(ns)</sup>	0,102 <sup>(ns)</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	0,741 <sup>(ns)</sup>	0,006 <sup>s</sup>	ns	1,000 <sup>(ns)</sup>	1,000 <sup>(ns)</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	0,103 <sup>(ns)</sup>	0,053	1,000 <sup>(ns)</sup>	ns	1,000 <sup>(ns)</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,053 <sup>(ns)</sup>	0,102	1.000 <sup>(ns)</sup>	1,000 <sup>(ns)</sup>	ns

Keterangan ns : no signifikan  
s : signifikan pada p < 0,005

Pada tabel 5.3 dan tabel 5.4 terlihat bahwa kadar kolesterol tikus yang diberi MLT dan PTU (kontro positif) lebih tinggi dari tikus normal (kontrol negatif) dan berbeda nyata ( $p < 0.05$ ). Dan kadar kolesterol tikus yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB bersamaan MLT dan PTU rendah dibandingkan kolesterol tikus kontrol positif dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Dan kadar kolesterol tikus yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB tidak berbeda nyata dengan tikus kontrol negatif ( $p > 0.05$ ). Kadar kolesrol tikus yang



diberi ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kg BB dan dosis 20 mg/kg BB kadarnya tidak berbeda nyata dengan pemberian dosis 5 mg/kg BB ( $p > 0,05$ ).

### 5.3 Hasil Pengukuran Kadar Oksida Nitrogen (NO) Serum.

Tabel 5.5 Kadar Nitrogen Mono Oksida (NO) pada Tikus Hiperkolesterol setelah diberi Ekstrak Terpurifikasi Daun Surian(*Toona Sureni BL Merr*) pada berbagai Dosis

No Tikus	kadar NO (EDRF) dalam serum (mcg/Ldl)				
	kontrol positif	kontrol negative	5mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	222.57	433.55	424.86	219.74	275.23
2	231.73	311.78	330.97	226.06	200.76
3	355.53	369.34	386.02	201.52	244.53
4	270.93	421.79	403.32	200.50	240.92
5	307.90	371.56	388.36	200.66	178.45
rata-rata ± SD	278,33 ± 54,41	381,60± 48,57	386,74 ± 34,78	209,69± 12,26	227,97 ± 38,30

Tabel 5.6 Kebermaknaan Hasil Pengukuran Kadar NO dengan Analisa statistik Bonferroni

	Kontrol ( - )	Kontrol ( + )	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol ( - )	ns	0,006 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Kontrol ( + )	0,006 <sup>s</sup>	ns	0,004 <sup>s</sup>	0,153 <sup>ns</sup>	0,667 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>s</sup>	ns	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	0,000 <sup>s</sup>	0,153 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,000 <sup>s</sup>	0,006 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns

Keterangan ns : no significan  
s : signifikan pada  $p < 0,005$

Pada tabel 5.5 dan tabel 5.6 terlihat bahwa kadar NO/EDRF tikus hiperkolesterol yang diinduksi MLT dan PTU (kontro positif) rendah dari tikus normal (kontrol negatif), kadar kedua kelompok ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

Kadar NO/EDRF tikus yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB bersamaan dengan MLT dan PTU tinggi dibandingkan NO/EDRF tikus kontrol positif, kadar kedua kelompok ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ), tetapi kadarnya sama dengan kadar NO/EDRF tikus normal (kontrol negatif) dan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Kadar NO/EDRF pemberian ekstrak terpurifikasi 10 mg/kg BB dan dosis 20 mg/kg BB kadar NO nya tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Jika dibandingkan dengan kontrol positif maupun kontrol negatif kadarnya lebih rendah dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

**5.4 Hasil Pengukuran Kadar *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) Serum**

Tabel 5.7 Kadar VCAM Serum pada Tikus Hiperkolesterol Setelah Diberi Ekstrak Terpurifikasi Daun Surian(*Toona Sureni BL Merr*) pada Berbagai Dosis

No Tikus	kadar VCAM Dalam Serum (mcg/dl)				
	Kontrol positif	Kontrol negative	dosis 5 mg/kg BB	dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
1	1543.56	1708.74	1261.78	1815,63	970.28
2	1708.74	2000.24	1912.79	1980.01	1009.15
3	2136.27	1135.46	1893.36	1611.58	1368.66
4	1106.31	2243.16	1096.60	1747.61	1135.46
5	1650.44	1786.48	1873.93	1798.91	1130.89
Rata-rata ± SD	1629.06 ±369.00	1774.82 ± 413.35	1607.69 ± 395.74	1790.91 ±133.01	1122.89 ±155.60



Tabel 5.8 Kebermaknaan Hasil Pengukuran Kadar VCAM-1 dengan Analisa Statistik Benferroni

	Kontrol (-)	Kontrol (+)	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol (-)	ns	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0.041 <sup>s</sup>
Kontrol (+)	1,000 <sup>ns</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,205 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	0,257 <sup>ns</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	0,034 <sup>s</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,041 <sup>s</sup>	0,205 <sup>ns</sup>	0,257 <sup>s</sup>	0,034 <sup>s</sup>	ns

Keterangan ns : no signifikan  
s : signifikan pada  $p < 0,005$

Pada tabel 5.7 dan tabel 5.8 terlihat bahwa kadar VCAM tikus hiperkolesterol yang diinduksi dengan MLT dan PTU (kontrol positif), tikus normal (kontrol negatif), diberi ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB dan dosis 10 mg/kg BB kadarnya tidak berbeda nyata  $p > 0,05$  . sedangkan pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB kadar VCAM rendah dibandingkan perlakuan lain, dan kadar ini berbeda nyata  $p < 0,05$ .

5.5 Hasil Pemeriksaan Lesi Aterosklerosis

5.5.1 Hasil Pengamatan Ketebalan Dinding Pembuluh Aorta.

Tabel 5.9 : Tebal Dinding Pembuluh Darah Aorta Tikus Hiperkolesterol Setelah Diberi Ekstrak terpurifikasi Daun Surian(*Toona sureni* BL Merr) pada Berbagai Dosis

No Hewan	Tebal dinding aorta (µm)				
	kontrol positif	kontrol negative	5 mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	128.80	92.29	95.29	91.33	127.80
2	125.60	94.50	93.58	97.51	121.30
3	127.80	90.16	94.11	93.11	123.50
4	123.50	95.19	96.08	99.66	119.50
5	125.60	91.83	95.21	94.43	118.60
Rata-rata ± SD	126.26 ± 2.08	92.79 ± 2.05	94.85 ± 0.99	95.21 ± 0.45	122.14 ±1.64

Tabel 5.10 Analisa Statistik Benferroni Hasil Pengukuran Tebal Aorta

	Kontrol (-)	Kontrol (+)	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol (-)	ns	0,000 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Kontrol (+)	0,000 <sup>s</sup>	ns	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	0,219 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	0,000 <sup>s</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,000 <sup>s</sup>	0,219 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	ns

Keterangan ns : no signifikan

s : signifikan pada  $p < 0,005$

Terlihat pada tabel 5.9 dan tabel 5.10 tebal dari dinding aorta tikus normal (kelompok kontrol negatif), dosis 5 mg/kg BB dan dosis 10 mg/kg BB dinding aortanya lebih tipis dari kelompok tikus hiperkolesterol yang diinduksi dengan MLT dan PTU (kontrol positif), dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Tebal dinding aorta kelompok yang diberikan ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB dan dosis 10 mg/kg BB ketebalannya sama dengan tebal dinding kelompok kontrol negatif dan tebal ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ).

Tebal dinding aorta pada pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB lebih tebal dibandingkan dengan tebal dinding aorta kelompok kontrol negatif, kelompok dosis 5 mg/kg BB dan dosis 10 mg/kg BB dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). tetapi masih kurang tebal dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).



5.5.2 Hasil Pengamatan Tingkat Kerusakan Sel Endotel Dinding Pembuluh Aorta.

Tabel 5.11 . Tingkat Kerusakan Sel Endotel Pembuluh Darah Aorta Tikus Hiperkolesterol Setelah diberi Ekstrak terpurifikasi Daun Surian(*Toona sureni* BL Merr) pada Berbagai Dosis

No Tikus	Tingkat Kerusakan Dinding Pembuluh Darah Arteri				
	Kontrol Positif	Kontrol Negative	dosis 5 mg/kg BB	dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
1	4	1	1	2	3
2	4	1	2	2	3
3	4	1	1	1	1
4	4	1	1	2	3
5	3	1	2	2	4
TOTAL	19	5	7	9	11

Tabel 5.12 Analisa kebermaknaan Pengukuran kerusakan lapisan sel endotel aorta tikus secara Statistik Kruskal-Wallis Test Hasil

Ranks

	VAR00007	N	Mean Rank
VAR00002	1.00	5	5.00
	2.00	5	22.10
	3.00	5	8.20
	4.00	5	11.40
	5.00	5	18.30
	Total	25	

Keterangan:

1. Kontrol negatif

2. Kontrol positif

3. Dosis 5 mg/kg BB

4. Dosis 10 mg/kg BB

5. Dosis 20 mg/kg BB

Terlihat pada tabel 5.11 dan tabel 5 12 tingkat kerusakan lapisan sel endotel kelompok tikus yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB, 10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB kecil dari tingkat kerusakan tikus hiperkolesterol yang di induksi dengan MLT dan PTU (kontrol positif). Secara berurutan nilai rangkingnya tingkat kerusakan yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB,

10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB adalah 8,20an ; 11,40 dan 18,40 sedangkan kontrol positif adalah 22,10. Kerusakan sel endotel pada pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB mendekati tingkat kerusakan lapisan sel endotel kontrol negatif. Sedangkan tingkat kerusakan lapisan sel endotel pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB mendekati tingkat kerusakan lapisan sel endotel kontrol positif.





## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Hasil Pemeriksaan Ekstrak terpurifikasi Daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)

Setelah dilakukan karakterisasi ekstrak terpurifikasi ternyata mengandung asam galat yang masih tercampur dengan senyawa lain. Pernyataan ini berdasarkan ekstrak terpurifikasi pemeriksaan nilai Rf KLT ekstrak terpurifikasi eluen Hexan/EtOac perbandingan 4:6 adalah 0,53 dan sedangkan standar asam galat 0,56. Spektrum dengan alat Spektrofotometer UV-Vis dalam pelarut metanol ekstrak terpurifikasi menunjukkan bahwa panjang gelombang  $\lambda$  271 nm dan sama dengan asam galat standar  $\lambda$  271 nm. (tabel 5.1, lampiran 2 dan gambar 4).

Hasil analisis spektrum FTIR ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni* BL Merr) seperti terlihat pada lampiran 5 dan gambar 5 memiliki serapan ulur pada daerah bilang gelombang 3414 (O-H); 2933 (C-H); 1693 (C=O); 1619 (C=C cincin benzen); serapan ulur ini sangat mendekati spectrum IR asamgalat standar terlihat pada lampiran 2 gambar 5 dan gambar 6 dari data ini memperkuat ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni* BL Merr) adalah mengandung asam galat.

Hasil pemeriksaan HPLC pada lampiran 2 gambar 5 terlihat ekstrak terpurifikasi dari daun surian (*Toona Sureni* BL Merr) memiliki waktu retensi 2,99; 3,27 dengan luas area adalah 55,91 % dan 35,56 %. Dari data ini ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni* BL Merr) dinyatakan memang belum murni, karena memiliki 2 buah puncak, puncak 2,99 sama dengan puncak asam galat ( lampiran 2 gambar 8). Puncak 2,99 ini adalah puncak dari asam galat dan puncak 3,27 perlu diteliti lebih lanjut. Tetapi yang dapat dikristal dengan pelarut

yang digunakan adalah asam galat. Dari hasil pemeriksaan senyawa yang ada pada ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni BL Merr*), secara organoleptis, reaksi kimia, KLT, spektrokopi UV, spektrokopi FT IR dan HPLC ekstrak terpurifikasi daun surian mengandung asam galat dan masih tercampur dengan senyawa lain. Walaupun noda pada KLT sudah tunggal ternyata ekstrak terpurifikasi ini masih mengandung 2 senyawa. Pada KLT diperoleh satu noda kemungkin karena antara asam galat dengan senyawa lain tersebut belum dapat terpisah dengan eluen yang digunakan. Tapi ternyata dengan HPLC kedua senyawa ini dapat terpisah diduga asam galat dan senyawa tersebut memiliki kepolaran yang sangat dekat, terlihat waktu retensi yang sangat dekat sekali yaitu asam galat 2,99 dan senyawa lain tersebut 3,27. Dari hasil penelitian hasil HPLC ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak terpurifikasi mengandung asam galat dan senyawa lain yang perlu diteliti lebih lanjut.

## 6.2 Hasil Pemeriksaan Kadar Kolesterol Serum

Hasil penelitian yang tercantum pada tabel 5.3 dan tabel 5.4 dan lampiran 3 tabel 2 dan tabel 3 menunjukkan bahwa kadar kolesterol total rata rata tikus kontrol positif tinggi jika dibandingkan dengan kadar kolesterol total hewan kontrol negatif dan berbeda nyata ( $p < 0.05$ ). Dari hasil ini pemberian makanan lemak tinggi (MLT) dan propiltiourasil (PTU) ternyata dapat meningkatkan kolesterol darah. Makanan lemak tinggi (MLT) merupakan campuran makanan standar dan lemak sapi, telur ayam dengan perbandingan 3: 1: 0,25, (Vogel, 2002). Lemak sapi digunakan untuk menginduksi karena mengandung asam lemak jenuh tinggi, yang dapat teroksidasi menjadi asetil ko-A sebagai sumber atom karbon utama dalam pembentukan kolesterol sehingga pemberiaanya dapat



meningkatkan kolesterol darah (Murray, *et al.*, 1997). Telur ayam juga sebagai sumber kolesterol eksogen. Untuk mengoptimalkan keadaan hiperkolesterol juga di beri propiltiourasil (PTU). Propiltiourasil memiliki mekanisme kerja dengan mengurangi pembentukan hormone tiroid sehingga menyebabkan berkurangnya kadar hormon tiroid (hipotiroidisme), dengan berkurangnya hormone tiroid tentu akan menurunkan metabolisme lemak dan akan mempercepat terjadinya hiperkolesterolemia (Murray, *et al.*, 1997; Sukandar, *et al.*, 1998; Guyton, 2006; Brown, 2006; Brunton, 2008).

Kadar kolesterol pada kelompok hewan yang diberikan ekstrak terpurifikasi 5 mg/kg BB nilai ini rendah dibandingkan dengan nilai kadar kolesterol hewan kontrol positif, dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Disimpulkan pemberian ekstrak terpurifikasi dosis ini dapat menekan kenaikan kolesterol. Cara senyawa ini menekan kenaikan kolesterol diduga mungkin sama dengan probukol, karena ekstrak terpurifikasi daun surian mengandung asam galat pada daun surian adalah asam galat memiliki sifat sebagai antioksidan. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Toru *et al* (1987) probukol dapat menurunkan kolesterol yang juga memiliki sifat antioksidan. Probukol menghambat aterogenesis dengan membatasi modifikasi oksidatif LDL dan kemudian membatasi transformasi sel makrofag membentuk sel busa. Penelitian lain menunjukkan kemungkinan probukol memodifikasi bentuk oksidasi LDL yang akan menghasilkan sel busa pada proses aterosklerosis in vivo (Toru *et al* 1987; Issandou, 2006; Brunton, 2008).

Kadar kolesterol pada kelompok tikus yang diberikan ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kg BB dan 20 mg/kg BB kadar ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kadar tikus yang diberi dosis 5 mg/kg BB. Dari hasil ini terlihat

peningkatan dosis pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian efek penekanan kenaikan kolesterol tidak meningkat. Dari hasil ini dosis yang diberikan jangan melebihi dosis 5 mg/kg BB.

Penelitian sama yang telah dilakukan tentang efek asam galat (GA), asam linoleat (LA), campuran GA dan LA (MGL), dan asam galat-linoleat ester asam (octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, Gle) yang dibuat secara sintesis terhadap hiperlipidemia pada tikus yang diberi diet tinggi lemak. Setelah 7 minggu, pemberian semua senyawa ini berat badan rata-rata tikus normal dan kelompok Gle lebih rendah dibandingkan dengan kelompok diberi MLT ( $p < 0,05$ ). Lipid plasma seperti trigliserida dan LDL-kolesterol yang ditemukan menurun ( $p < 0,05$ ) pada pemberian Gle, GA, LA, dan tikus yang diberi MGL bila dibandingkan dengan tikus diberi MLT. Tapi HDL kolesterol meningkat ( $P < 0,05$ ) pada tikus yang diberi MLT dan diberi Gle bila dibandingkan dengan tikus normal. Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian Gle sintetik dari asam galat dan ester asam linoleat mungkin memiliki efek hipolipidemik yang potensial pada tikus yang diberi MLT. (Jang *et al.*, 2008)

### 6.3 Pengukuran Kadar Oksida Nitrogen (NO) Serum.

Hasil penelitian seperti terlihat pada tabel 5.5 dan tabel 5.6 dan lampiran 3 tabel 5 dan tabel 6 terlihat bahwa kadar NO tikus hiperkolesterolemia (kontrol positif) kadar NO(EDRF) nilainya rendah jika dibandingkan dengan kadar NO tikus yang hanya diberi makanan standar (kontrol negatif) dan kadar ini berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Dari hasil ini terbukti hiperkolesterol telah menyebabkan disfungsi sel endotel ditandai dengan turunya kadar NO.



Pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kgBB kadar NO nya sama sama dengan kadar NO tikus kontrol negatif dan kadar ini tidak berbeda nyata  $P > 0,05$ . Disimpulkan ekstrak terpurifikasi *T.sureni* dosis 5 mg/KgBB terlihat dapat mencegah disfungsi sel endotel dan di duga dapat menghambat oksidasi LDL. Sehingga tidak terjadi oksidasi asam lemak tidak jenuh (polyunsaturated Fatty Acid/PUPA) yang merupakan struktur dari membran sel endotel. Efek antioksidan ini diduga diberikan oleh asam galat dan senyawa lain yang belum teridentifikasi yang terkandung dalam ekstrak terpurifikasi daun surian. Efek antioksidan didukung oleh penelitian dengan menggunakan metode pengikatan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) pada fraksi etilasetat yang dilakukan oleh Romi (2009). Sesuai dengan pernyataan Pratt dan Hudson 1990 senyawa alami yang memiliki efek antioksidan adalah senyawa fenolik dan polifenol. Polifenol dapat berupa golongan flavonoid, asam galat, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik polifungsional. Asam galat yang terkandung pada ekstrak terpurifikasi adalah termasuk golongan polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan (Pathak *et al.*, 2004).

Pemberiaan ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kgBB, 20 mg/Kg BB kadar NO (EDRF) nya dibawah kadar NO (EDRF) tikus kelompok kontrol positif (hiperkolesterol) dan juga dibawah kadar NO tikus kelompok negatif dan berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Dari hasil ini berarti dosis ini tidak mampu memproteksi disfungsi sel endotelia yang di induksi dengan hiperkolesterol. pada tikus ini kadar NO malah dibawa kadar NO hewan normal, diduga bila dosis ditingkatkan diatas 5 mg/kg BB malah menyebabkan kerusakan sel endotel. Oleh sebab itu kadar NO yang dihasilkan oleh sel endotel berkurang. Hal ini diduga asam galat

dan senyawa yang belum teridentifikasi yang terkandung pada ekstrak terpurifikasi daun surian ini terakumulasi pada sel endotel tentu akan merusak dan mengganggu fungsi sel endotel. Pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kg BB dan dosis 20 mg/kg BB tidak dapat melindungi sel endotel dari kerusakan reaksi oksidatif yang di induksi dengan hiperkolesterol, sesuai dengan teori kalau dosis suatu obat ditingkatkan terus akan mencapai kadar darah yang toksik dan menimbulkan kerusakan (Brunton, 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh peneliti lain dengan menggunakan ekstrak akar *Caesalpinia benthamiana* yang banyak mengandung senyawa fenolik (asam galat, tanin dan resveratrol). Peneliti ini melaporkan bahwa ekstrak air *C. benthamiana* mempengaruhi produksi enzim isoform endotel sintase oksida nitrat (eNOS) diukur dengan quantitative polymerase chain reaction (QPCR) analisis. Aktivitas *scavenging* dinilai terhadap spesies oksigen reaktif (ROS), seperti anion superoksida, Hidrogen peroksida, dan asam hipoklorit (HOCl). Kerja ekstrak air *C. benthamiana* pada radikal O juga diuji dengan model fisiopatologi oksidatif dengan menggunakan neutrofil polimorfonuklear manusia yang dirangsang dengan asetat miristat phorbol. Hasil penelitian ekstrak air *C. benthamiana* tersebut memiliki sifat yang signifikan sebagai vasorelaksasi aorta terisolasi tikus yang diinduksi dengan fenileprin. Ekstrak ini juga mempengaruhi aktivitas radikal bebas (ROS) dan merangsang ekspresi mRNA eNOS. (Zamblé *et al.*, 2008).

#### **6.4 Kadar *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) serum**

Dari tabel 5.7 dan tabel 5.8 lampiran 3 tabel 8 dan tabel 9 terlihat kadar VCAM serum tikus kelompok hewan positif dan kontrol negatif, kadarnya tidak



berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Hasil ini bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa ekspresi gen VCAM-1 akan meningkat berkaitan dengan terjadi disfungsi sel endotel pada penyakit kardiovaskular. Perkembangan lesi aterosklerotik berkorelasi positif dengan lama mengkonsumsi diet tinggi kolesterol (Verbeuren *et al.*, 1994). LDL teroksidasi dan sitokin seperti interleukin-1 (IL-1) dan tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) yang diproduksi oleh monosit yang teraktivasi adalah sebagai kemoatraktan penting bagi monosit dan menginduksi ekspresi molekul adhesi vaskular-1 (VCAM-1). Ekspresi VCAM-1 pada sel endotel aorta terjadi awal aterogenesis, dan terjadi setelah hanya 1 minggu makan kolesterol tinggi sebelum terlihat terjadi perubahan morfologi. (Li *et al.*, 1993). Mekanisme pengaturan transkripsi ekspresi gen VCAM-1 mungkin disensitisasi oleh reaksi redoks dan dapat dihambat oleh antioksidan (Marui *et al.*, 1993). Tikus yang diberi MLT kadar kolesterolnya (LDL) meningkat. Hiperkloesterol memudahkan LDL yang memiliki kecenderungan melekat pada dinding pembuluh darah dan menyusup ke dalam intima. Kadar LDL yang tinggi menyebabkan LDL akan mengalami oksidasi tahap pertama sehingga terbentuk LDL teroksidasi. LDL-teroksidasi (radikal bebas) akan menyebabkan disfungsi sel endotel akan memicu terbentuknya molekul *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)*, *intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)* (Yamamoto *et al.*, 2008; Rohatgi *et al.*, 2009).

Tidak meningkatnya kadar VCAM-1 pada kelompok tikus yang diberi MLT ini diduga karena untuk menginduksi kenaikan kolesterol, juga dipakai propiltiourasil (PTU). Propiltiourasil adalah obat yang bekerja mengurangi produksi hormone tiroid. Hasil penelitian melaporkan bahwa kadar VCAM-1

tinggi pada pasien hipertiroid yang disebabkan gangguan auto immum yang berkaitan dengan inflamasi pembuluh darah (Jublanc, 2011). Jika hormone tiroid berkurang akibat pemberian PTU ternyata kadar VCAM-1 turun.

Penelitian yang dilakukan di Polandia mengevaluasi pengaruh hipertiroidisme subklinis dan pada pasien yang telah menunjukkan gejala hipertiroidisme, ternyata kadar VCAM-1 tinggi secara signifikan baik pada pasien dengan hipertiroidisme subklinis maupun pasien yang menunjukkan gejala hipertiroid dibandingkan orang normal (Modzelewska *et al.*, 2007). Hasil penelitian yang dilakukan Jublanc 2010 kadar serum VCAM-1 secara signifikan meningkat pada pasien dengan hipertiroidisme dibandingkan dengan pasien euthyroid dan hipotiroid. Pada pasien hipertiroid yang telah diobati ternyata kadar VCAM-1 turun secara signifikan setelah mereka menjadi eutiroid (Jublanc *et al* 2010).

Kadar VCAM-1 serum tikus yang diberikan ekstrak terpurifikasi dosis 5 mg/kg BB, 10 mg/kg BB tidak dapat diambil kesimpulan apakah ada pengaruh atau tidak karena hasilnya diduga dipengaruhi oleh pemberian PTU. Tidak adanya perbedaan kadar VCAM-1 pada semua perlakuan kecuali pada pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB bukan karena metoda atau reagen rusak, hal ini didasarkan pada kenyataan kadar VCAM-1 pada kelompok tikus yang diberi ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB rendah dibandingkan yang lain dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Disimpulkan ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB dapat menurunkan kadar VCAM. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Lee *et al.*, 2006 asam 4-O-metil galat (4-OMGA) telah diidentifikasi sebagai metabolit utama asam galat dalam plasma dan urin manusia setelah mengkonsumsi teh



hitam dan anggur merah. 4-O-metil galat menghambat ekspresi adhesi sel vaskular molekul-1 (VCAM-1) pada sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVECs) yang dirangsang dengan tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) , sehingga menekan adesi leukosit ke sel endotel vena umbilikalis manusia HUVECs (Lee *et al.*, 2006).

## **6.5 Pemeriksaan Lesi Aterosklerosis**

### **6.5.1 Ketebalan Dinding Pembuluh Aorta.**

Hasil pengamatan dari penelitian pada tikus putih hiperkolesterol yang diinduksi dengan MLT dan PTU yang diberikan selama 2 bulan memang terjadi kerusakan sel endotel aorta dan hasil yang sama juga telah dibuktikan dari penelitian sebelum ini. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sukandar 1998 tikus jantan putih akan menunjukkan perkembangan lesi aterosklerosis yang signifikan setelah 2-3 bulan (Prasetyo *et al.*, 2000; Verbeuren, 2006).

Pada tabel 5.9 dan tabel 5.10 dan lampiran 3 tabel 11 dan tabel 12 dapat dilihat hasil pengukuran tebal dinding aorta kontrol positif, diperoleh tebal dinding lebih tebal dari hewan kontrol negatif dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Hal ini disebabkan karena pada tikus yang diberi MLT ternyata terjadi peningkatan kolesterol ( tabel 5.3 ). Hiperkolesterol akan memicu terbentuk aterosklerosis yang ditandai terjadi proliferasi sel otot polos pembuluh aorta dan dapat meningkatkan tebal dinding aorta (Yamamoto *et al.*, 2008; Rohatgi *et al.*, 2009).

Hiperkolesterol dapat menyebabkan molekul low density lipoprotein (LDL) mudah teroksidasi, sehingga terbentuk gugus hidroksil pada sel endotel dan otot polos pembuluh darah. Radikal hidroksil ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (polyunsaturated Fatty Acid/PUPA) yang merupakan struktur dari

membran sel termasuk sel endotel sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang akan menghasilkan peroksidasi peroksid. LDL teroksidasi dan lipid peroksid yang terbentuk merusak membran sel endotelium pembuluh darah menampilkan molekul VCAM-1 dan menarik sel monosit dan roling dan bermigrasi ke lapisan sub endotel yang diikuti oleh LDL teroksidasi juga masuk ke daerah sub endotel. Pada subendotel monosit berubah jadi makrofag. Makrofag akan menfagosit LDL teroksidasi yang akan membentuk sel busa. Makrofag juga akan menghasilkan faktor pertumbuhan yang menyebabkan proliferasi sel otot polos dinding pembuluh darah yang akan memperparah kerusakan dinding pembuluh darah. (Lawrence, 2006; Weinberg, 2004; Robert, 2008 ).

Pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 5mg/KgBB berpengaruh terhadap ketebalan dinding pembuluh aorta dimana tebal dindingnya adalah mendekati tebal dinding aorta hewan normal (kontrol negatif) seperti terlihat pada lampiran 3 tabel 15 dan tabel 16 dan tebal kedua kelompok ini tidak berbeda. Jika dikaitkan dengan kadar NO pemberian dosis 5 mg/KgBB ini dapat mempertahankan kadarnya sama dengan kadar NO hewan kontrol negatif ( tabel 5.5 dan lampiran 3 tabel 7 dan tabel 8 ) Hasil ini memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 5 mg/kg BB, bersamaan makanan lemak tinggi dan PTU dapat mencegah terjadi aterosklerosis dan tidak terjadi proliferasi sel otot polos pembuluh aorta, dan dosis ini juga mencegah terjadinya disfungsi sel endotel.

Pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian juga berpengaruh terhadap ketebalan dinding pembuluh aorta dosis 10 mg/KgBB dimana tebal dindingnya adalah mendekati tebal dinding aorta hewan kontrol negatif seperti terlihat pada



lampiran 3 tabel 7 dan tabel 8 dan tebal kedua kelompok ini tidak berbeda. Jika dikaitkan dengan kadar NO pemberian dosis 10 mg/KgBB ini kadarnya rendah jika dibandingkan dengan kadar NO hewan kontrol negatif berbeda nyata  $P < 0,05$  ( tabel 5.5 dan lampiran 3 tabel 7 dan tabel 8 ) Hasil ini memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 10 mg/kg BB, bersamaan makanan lemak tinggi dan PTU dapat mencegah terjadi aterosklerosis dan tidak terjadi proliferasi sel otot polos pembuluh aorta, dan dosis ini tidak mencegah terjadinya disfungsi sel endotel.

Tebal dinding aorta yang diberi ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 20 mg/kgBB bersamaan makanan lemak tinggi dan PTU lebih tebal dari aorta yang diberikan dosis 5 mg/kg BB dan dosis 10 mg/kg BB dan kelompok kontrol negatif dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ), dimana kurang tebal dibandingkan aorta tikus kontrol positif. Disimpulkan pemberian dosis 20 mg/Kg BB dapat mencegah terbentuknya aterosklerosis tapi efeknya berkurang dibandingkan dengan pemberian dosis 5mg/KgBB dan dosis 10mg/KgBB. jika dikaitkan dengan kadar NO pemberian dosis 20mg/KgBB kadarnya rendah dibanding dengan pemberian dosis 5 mg/KgBB dan tikus kontrol negatif. Dari hasil ini dapat disimpulkan peningkatan dosis yang diberikan, ternyata menyebabkan disfungsi sel endotel dan efeknya sebagai anti aterosklerosis berkurang. Hal ini sesuai dengan teori suatu obat bila dosis ditingkatkan maka akan menimbulkan efek toksis (Lu, 1995).

#### **6.5.2 Tingkat Kerusakan Sel Endotel Dinding Pembuluh Aorta**

Terlihat pada tabel 5.11 dan tabel 5.12 tingkat kerusakan sel endotel pembuluh darah aorta hewan kontrol negatif (diberi skor 1), dengan nilai

rangkingnya 5, lapisan endotel kontinitas tidak terputus-putus dan tidak terjadi proliferasi sel otot polos. tunika intima dengan lapisan sel endotel yang utuh (lampiran 4 gambar 2 dan gambar 7). Sedangkan lapisan endotel pada kelompok hewan hiperkolesterol yang diinduksi dengan MLT dan PTU (kontrol positif diberi skor 4) dengan nilai rangkingnya 22,1 pada pengamatan terlihat lapisan endotel kontinitasnya telah terputus-putus, karena terjadi kerusakan tunika intima (lampiran 4 gambar 1 dan gambar 6 ). Terputus nya kontinitas lapisan endotel adalah akibat terdapat nya ateroma yang mengandung kolesterol (lemak) pada daerah endotel dan sub endotel. Pada pembuatan preparat histopatologi aorta digunakan alkohol sehingga lemak yang terdapat (ateroma) pada daerah endotel dan sub endotel ini akan larut oleh alkohol sehingga meninggalkan lobang/sumur-sumur, pada lapisan endotel terlihat kontinitasnya telah terputus-putus

Pada lampiran 4 gambar 3 dan gambar 8 terlihat lapisan endotel pembuluh darah aorta hewan diberi ekstrak terpurifikasi daun surian 5mg/KgBB nilai rangkingnya 8,2, terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel yang tetap utuh. Jika dikaitkan dengan pengamatan kadar NO pemberiana dosis ini kadarnya sama dengan kontrol negatif ( $P > 0.05$ ) dan juga tebal dinding aorta sama dengan pemberian dosis 5 mg/kg BB dan kontrol negatif, disimpulkan hanya pemberian dosis ini yang memberikan efek terbaik terhadap disfungsi sel endotel, dan mencegah terjadinya penebalan dinding pembuluh darah aorta serta mencegah kerusakan lapisan sel endotel.

Pemberian ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 10 mg/kg BB dengan nilai rangkingnya 11,4, terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotel yang tetap utuh. Jika dikaitkan dengan pengamatan kadar NO pemberiana dosis ini



kadarnya rendah dari kontrol negatif ( $P > 0.05$ ) dan juga tebal dinding aorta sama dengan pemberian dosis 5 mg/kg BB dan kontrol negatif. Dari pengamatan ini pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kg BB terlihat dapat mencegah kerusakan (pemutusan kontinuitas lapisan endotel) dan mencegah terjadinya penebalan dinding pembuluh darah aorta dan tidak dapat memproteksi disfungsi sel endotel untuk menghasilkan NO.

Ekstrak terpurifikasi ini bisa memperbaiki dinding pembuluh dan mengurangi kerusakan yang terjadi pada dinding aorta. Hal ini disebabkan karena ekstrak terpurifikasi daun surian mengandung asam galat dan senyawa yang lain yang belum teridentifikasi. Dimana kedua senyawa ini dapat mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari LDL (Reiterer *et al*, 2004; Sofia, 2005), sehingga secara tidak langsung dapat memproteksi terbentuknya aterosklerosis.

Pada lampiran 4 gambar 5 dan gambar 10 pemberian dosis 20 mg/Kg BB ekstrak terpurifikasi dengan nilai rangkingnya adalah 18,3, lapisan sel endotel pembuluh aorta tikus putih tunika intima dengan lapisan sel endotelia yang terputus-putus. Ini berarti pemberian ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB ternyata menimbulkan kerusakan dan tidak dapat mencegah penebalan dinding pembuluh aorta dan kadar NO rendah dibandingkan kontrol negatif. Disimpulkan pemberian dosis 20 mg/Kg BB toksik terhadap sel endotel (Lu, 1995).

Adanya perbaikan kerusakan sel endotelia pemberian dosis 5 mg/kg BB oleh ekstrak terpurifikasi daun surian mungkin disebabkan oleh kandungan asam galat dan senyawa kedua yang terkandung dalam ekstrak terpurifikasi. Asam galat berfungsi sebagai antioksidan yang menghambat reaksi radikal bebas pada sel endotel dan mencegah oksidasi LDL (Zamblé *et al.*, 2008), Sehingga secara tidak

langsung metil galat dan senyawa lain yang belum teridentifikasi yang terkandung dalam ekstrak terpurifikasi daun surian dapat memproteksi aorta dari aterosklerosis. Penghambatan proses oksidasi LDL dapat memperkecil munculnya aterosklerosis.

Persentase luas lumen pembuluh darah pada penelitian ini tidak dilakukan karena pada saat pengukuran luas lumen didapat kesulitan pengukuran, karena pembuluh darah hewan uji lingkaran yang tidak beraturan tidak seragam sehingga rata-rata pengukuran mempunyai jarak yang jauh, sehingga pengukuran persentase luas lumen tidak dilakukan untuk mengatasi data yang tidak valid.

Secara ringkas dapat dijelaskan bahwa ekstrak terpurifikasi daun surian mengandung asam galat, dan senyawa ini telah terbukti pada beberapa percobaan bersifat antioksidan. Pada penelitian secara tidak langsung dapat mencegah perkembangan aterosklerosis yang diinduksi dengan MLT dan PTU. Hal ini dapat dilihat dengan adanya perbaikan tebal dinding pembuluh darah arteri, dan pengurangan kerusakan sel endotelia.



## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7. 1. Kesimpulan

- 1) Ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni BLMerr*) belum murni mengandung asam galat sebanyak 50,3 % dan sisanya senyawa lain yang belum dapat teridentifikasi.
- 2) Ekstrak terpurifikasi daun pada dosis 5 mg/kg BB efeknya paling baik memproteksi disfungsi sel endotel ditandai dengan dapat meningkatkan kadar NO tikus hiperkolesterol, dan mencegah penebalan dinding aorta dan mencegah kerusakan lapisan endotel.
- 3) Pemberian Ekstrak terpurifikasi dosis 10 mg/kg BB tidak dapat memproteksi disfungsi sel endotel tidak dapat meningkatkan kadar NO tikus hiperkolesterol, tetapi dapat mencegah penebalan dinding aorta dan mencegah kerusakan lapisan endotel.
- 4) Pemberian Ekstrak terpurifikasi dosis 20 mg/kg BB tidak dapat memproteksi disfungsi sel endotel ditandai dengan tidak dapat meningkatkan kadar NO tikus hiperkolesterol, juga tidak dapat mencegah penebalan dinding aorta dan mencegah kerusakan lapisan endotel.
- 5) Pemberiaan ekstrak terpurifikasi daun daun surian *Toona sureni BL Merr*) dosis 5 mg/kg BB; 10 mg/kg BB tidak mempengaruhi kadar VCAM serum. Sedangkan dosis 20 mg/kg BB dapat menurunkan kadar VCAM

## 7.2 Saran

- 1) Untuk melihat efek ekstrak terpurifikasi daun surian terhadap kadar VCAM tidak dianjurkan memakai PTU untuk mendapatkan hiperkolesterol, karena PTU terbukti pada penelitian menurunkan kadar VCAM-1 serum.
- 2) Disarankan untuk mencari metoda pemisahan yang tepat untuk memisahkan antara asam galat dengan senyawa kedua yang belum teridentifikasi karena pada rekaman HPLC keduanya memiliki waktu retensi yang dekat sekali, yang menyebabkan pada KLT hanya diperoleh 1 noda





## DAFTAR PUSTAKA

- Aboutabl MA, 2004. Nitric oxide and the bioactivities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. Article 140: 49.
- Allan M Lefer, Martin R Siegfried, Xin-liang Ma. 1993. Protection of Ischemia Reperfusion Injury by Sydnominine NO Donors via Inhibition of Neutrophil Endothelium Interaction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22, (4) : 27-33.
- Aqil F, I Ahmed , and Z Mehmood. 2006. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turk J Biol*, 30: 177-183.
- Atmapepasni. 1994. *Evaluasi Akticitas beberapa Fraksi Ekstrak Daun surian Toona sureniBL. Merr) Terhadap Penekanan Sistem Saraf pusat pada Mencit putih Jantan*. FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Barbacanne MA, J Rami , JB Michel , JP Souchard , M Philippe , JP Besombes , F Bayard , JF Arnal . 1999. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc Res*. 41(3) :672-681.
- Barreiro O, Yanez-Mo Maria, JM Serrador , MC Montoya, Vicente-Manzanares Miguel, *et al* 2002. "Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes". *J. Cell Biol*. (United States) 157 (7): 1233–1245.
- Bobe G, SJ Weinstein , D Albanes, T Hirvonen, J Ashby, PR Taylor,*et al*. 2008. Flavonoid Intake and Risk of Pancreatic Cancerin Male Smokers (Finland). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(3): 553-562.
- Brown MS and JL Goldstein. 2005. *Drugs Used in The Treatment of Hyperlipoproteinemias* in Goodman L.S.,A. Gilman, the Pharmacological Basis of Therapeutics (10<sup>th</sup> Ed). New York: Mc Graw Hill Medical Publishing Division.
- Burmester GR and A Pezzutto. (2003). *Color Atlas of Immunology*. Newyork: Thieme.
- Brunton L, P Keits, B Donald, B Lain. 2008. Goodman L.S.,A. Gilman, the Pharmacological Basis of Therapeutics (11<sup>th</sup> Ed). New York: Mc Graw Hill Medical Publishing Division.
- Chi-Tai Yeh and Gow-Chin Yen. 2005. Involvement of p38 MAPK and Nrf2 in

phenolic acid-induced P-form phenol sulfotransferase expression in human hepatoma HepG<sub>2</sub> cells. *Life Sciences & Medicine Carcinogenesis* 27 (5): 1008-1017

- Clair RWS. 1998. *The Contribution of Avian Model to Our Understanding of Atherosclerosis and Their promise for the Future* .48 (6). Winston-Salem. North Carolina: Department of Pathology. Section of Comparative Medicine. Wake Forest University School of Medicine.
- Constans J and C Conri. 2006. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*, 368(1-2):33-47.
- Cuong PV, NT Minh and NV Hung. 2007. Triterpenes from *Toona sureni* Moora (Meliaceae). *Chemistry*, 45 (6): 214-219.
- Crews P, J Rodriguez and M Jaspars. 1998 ,” *Organic Structure analysis*”, Oxford University Press, New York.
- Dahlan S. 2004. Seri statistik: statistika untuk kedokteran dan kesehatan uji hipotesis dengan menggunakan program SPSS. Jakarta: Arkans.
- Davies KJA and AP William. 2005. The evolution of *Free Radical Biology & Medicine*. A 20-year history. *Free Radical Biology & Medicine* 39: 1263–1290
- Deanfield J, A Donald, C Ferri, C Giannattasio, J Halcox, S Halligan, *et al.*, 2005. "Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension". *J Hypertens* 23 (1): 7-17.
- Departemen Kesehatan RI. (1979). *Farmakope Indonesia* (Ed. III). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Ekstrak Tumbuhan*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dessy C and O Ferron. September 2004. "Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature". *Current Medical Chemistry – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* (Bentham Science Publishers Ltd.) 3 (3): 207–216.
- Deviana. 2010. *Kolesterol Solusi Tepat Mengelola Kolesterol*. Yogyakarta: Cemerlang Publishing.
- Dewick, PM; Haslam, E 1969. "Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid", *Biochemical Journal* 113 (3): 537–542.



- Djam'an DF. 2002. *Informasi Singkat Benih Toona sureni* (Blume) Merr [http://www.dephut.go.id/INFORMASI/RRL/IFSP/Toona\\_sureni%20\\_Blume.pdf](http://www.dephut.go.id/INFORMASI/RRL/IFSP/Toona_sureni%20_Blume.pdf). diakses tanggal 1 Desember 2010.
- Djamal R. 2008. *Prinsip-prinsip dasar Bekerja Dalam Kimia Bahan Alam* Padang: Penerbit Universitas Baiturrahmah.
- Ekaprasada M Taufik, Hazli Nurdin, Sanusi Ibrahim, Dachriyanus. 2009. Antioxidant Activity Of Methyl Gallate Isolated From The Leaves Of *Toona Sureni*. *Indo. J. Chem.* 9 (3): 457 - 460
- Fairuz. 1994. *Penapisan Aktivitas Farmakodinamik Ekstrak Etanol Daun Surian (Toona sureni BL. Merr)*. Skripsi Sarjana Farmasi Universitas Andalas : Padang.
- Furie B & BC Furie 2005. "Thrombus formation in vivo". *J. Clin. Invest.* 115 (12):3355–3362.
- Ganiswara SG. 1995. *Farmakologi dan Terapi* edisi IV. Jakarta : Bagian Farmakologi Kedokteran Universitas Indonesia.
- Ganong WF and Stephen J. Mc Phee. 2006. *Pathology Basic of Disease* (4<sup>th</sup> ed). San Francisco: The Mc Graw Hill Company.
- Ghasemi A, M Hedayati and Biabani H. 2007. Protein Precipitation Methods Evaluated for Determination of Serum Nitric Oxide End Products by the Griess Assay . *Journal of Medical Sciences Research*, 15: 29-32.
- Gritter R, Boobit J M and Schwarting A E. 1991. *Pengantar Kromatografi Terbitan Kedua*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Grundy S M, JI Cleeman, CN Merz, et al., 2004. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatman Panel III guidelines. *Circulation* 110: 227-239.
- Gustafsson M, C Flood, P Jirholt, J Borén. 2004. Retention of atherogenic lipoproteins in atherogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 61: 4–9.
- Gustafsson M, M Levin, K Skålen, J Perman, V Fridén, P Jirholt, et al., 2007. Retention of low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of the mouse: evidence for a role of lipoprotein lipase. *Circ Res.* August 30.
- Guyton AC and JE Hall. (1997). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. (Ed 9). Penerjemah: I, Setiawan. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.

- Guyton AC and JE Hall. 2006. *medical physiology* 11<sup>th</sup> ed: 216-245. Phyladelphia: Elsevier Sauders Company.
- Gwangsoo Lee, Hee-Jun Na, Seung Namkoong, Ho Jeong Kwon, Sanghwa Han, Kwon-Soo Ha, *et al.*, 2006. 4-*O*-methylgallicacid down-regulates endothelial adhesion molecule expression by inhibiting NF- $\kappa$ B-DNA-binding activity, *European Journal of Pharmacology*. 551, (1), 3:143–150
- Hackam DG. 2006. Intensive reduction of low-density lipoprotein-cholesterol: implications of recent trials. *Am J Cardiovasc Drugs*.6: 367–371.
- Haghjooyjavanmarda S, N Mehdi, M Alireza, S Masoud. 2008, Von Willebrand Factor, C-Reactive Protein, Nitric Oxide, And Vascular Endothelial Growth Factor In A Dietary Reversal Model Of Hypercholesterolemia In Rabbit. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 152(1):91–95.
- Halliwell B and JMC Gutteridge. 2007. *Free radicals in biology and medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Clarendon, Oxford
- Halliwell B and JJ Rafter, 2005. A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am. J Clin. Nutr.* 8:268–276
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141:312–322
- Han Seong Soo, Seog Cho Lo, Yong wa Choi, Jin Ho Kim, and Seung Hwa Baek. 2004 Antioxidant Activity of Crude Extract and Pure Compounds of *Acer ginnala* Max. *Bull. Korean Chem. Soc.* 25 (3): 389.
- Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 352: 1685–1695.
- Harbone JB and H Baxter, 1999. *The Handbook Of Natural Flavonoid*, Volume I, John Wiley & Sons, England.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada lanjut usia. *J MIPA*. (14): 52-60.
- Heim K E, AR Tagliaferro and DJ Bobilya 2002 “Flavonoid Antioxidant: chemistry, metabolism, structure- activity relationship”, *J. Nut. Biochem.* (13): 572-584.
- Heinrich M, B Joanne, Simon, MW Elizabeth. 2005. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Alih bahasa Winny.R dkk. Penerbit Buku Kedokteran EGC.



- Hidalgo M, Martin SS, Recio I, Sanchez-Moreno C, de Pascual-Teresa B Rimbach G, de Pascual-Teresa S. 2012. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr.* 7(2):295-306
- Houghton PJ and R Amala. 1998. *Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman&Hall.
- Howard K S. 2007. cGMP-Dependent Protein Kinase I and Smooth Muscle Relaxation: A Tale of Two Isoforms', *Circ. Res.* 101:1078–1080
- Ifmaily. 1996. *Isolasi Flavonoid dari Daun Surian (Toona sureni BL. Merr)*. Jurusan Farmasi.FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Issandou M. 2006. Pharmacological regulation of low density lipoprotein receptor expression: current status and future developments. *Pharmacol Ther.* 111: 424–433
- Jang A, Srinivasan P, Lee NY, Song HP, Lee JW, Lee M, Jo C. 2008. Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid-linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. *Chem Biol Interact.*30;174(2):109-117
- Jialal I, S Devaraj and U Singh. 2006. Sources of CRP in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.*168(3):1054-1055.
- Jublanc C, JL Beaudeau, F Aubart, M Raphael, R Chadarevian, MJ Chapman, 2011. Serum level of adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases ,TIMP-1 Are elevated in patients with autoimmune thyroid disorders: relevance to vascular inflammation. *Nutr metab Cardiovasc Dis*,21 (10): 817-22.
- Katzung BG. 2007. *Basic and Clinical Pharmacology* (10<sup>th</sup> ed). Departement of Cellular & Molecular Pharmacology University of California, San Francisco : Mc Graw Hill Companies.
- Kiernan J A. 1990, *Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice*, Pergamon Press, Oxford New York.
- Kita T, N Yutaka, Y Masayuki, I Kenji, K Noriaki, O Akira.1987. *Probucol Prevents The Progression Of Atherosclerosis In Watanabeheritable Hyperlipidemic Rabbit, An Animal Model For Familial Hypercholesterolemia.* (5).
- Klabunde RE. 2011. *Nitric Oxide . Cardiovascular Physiology Concepts . 2<sup>th</sup>* Published by Lippincott Williams & Wilkins.

- Kleinbongard P, A Dejam, T Lauer, T Jax, S Kerber, P Gharini. 2006. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med*; 40(2):295-302.
- Koolman J and KM Röhm. 2000. *Atlas Berwarna & Teks Biokimia*. Penerjemah: S. I. Wanandi. Jakarta: Hipokrates.
- Kratz JM, Andrighetti-Fröhner CR, Leal PC, Nunes RJ, Yunes RA, Trybala E, Bergström T, Barardi CR, Simões CM. 2008. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol Pharm Bull*.31(5):903-907.
- Kraus W.1997. Surenone and Surenine Two Novel Tetranortriterpenoid from *Toona sureni* BL. Merr. *Tetrahedron letter* , 29.
- Kumalaningsih S. 2007 Antioksidan, sumber dan manfaat. *Artikel Antioksidan Center*.
- Kumar V, RS Cotran and SL Robbins. 2007 . *Buku Ajar Patologi* (Ed 7). Penerjemah Brahm U. Pendit. Jakarta: EGC.
- Lawrence GS. 2004. *Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas*. Makassar: Unit Riset Vascular, bagian Patologi, FK Unhas, RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.
- Lees R S. 2005 *Hyperlipidemia and Atherosclerosis in Principles of Pharmacology* Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology
- Leeson C R, TS Leeson, AA Paparo. 1989, *Buku Ajar Histologi*, ed 5, Diterjemahkan oleh Staf Ahli Histologi FKUI, Penerbit Buku Kedokteran UI, Jakarta.
- Ley K and Y Huo. 2001. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 107(10): 1209-1210.
- Libby P, PM Ridker and A Maseri. 2003. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143.
- Li Xiangdong, Yuanwu Liu, Huang Zang, Liming Ren, Qinyau Li, Ning Li. 2011. *Animal model for the atherosclerosis research: a review*. Higher Education Press and Springer-Verlag, Berlin-heidelberg
- Lotito SB & Frei B 2006. "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?" *Free Radic. Biol. Med.* 41 (12); 1727–1746.



- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi dasar, azas, organ sasaran, dan penilaian resiko* (Edisi II). Penerjemah : E. Nugroho, Z.S Bustami dan Z. Darmansyah. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Lucia Turcan, Mihai Todiraş. 2003. Mechanism Of Vascular Relaxation Of The Fruits Of Black Chokeberry Extracts (*Aronia Melanocarpa Michx. Elliot.*) „Ovidius” University Annals Of Medical Science - Pharmacy 1(1). *National Institute Of Pharmacy, Chisinau, Md-2028, Moldova.*
- Luscher TF, Barton M. 1997. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20 (2): 3-10.
- Mabberley DJ, CM Pannel and AM Sing. 1995. *Flora Malaysia*. Series I-Spermatophyta. Meliaceae. 12. Part 1: 1678-1683
- Mangino J, 1997. Quality Assurance and Quality Control. International Panel on Climate Change (IPPC) 1: 6-17
- Mappahya, A Ali dan M Ilyas. 2006. *Kadar Nitric Oxide (NO) dan High-Sensitivity C-Reactive Protein (hs-CRP) pada Penderita Sindroma Koroner Akut di Makassar*. Bagian Kardiologi FK UNHAS.
- Markham KR. 1988. *Techniques of Flavonoid Identification (Cara Mengidentifikasi Flavonoid)*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Mawji IA, GB Robb, SC Tai, PA Marsden. 2004. "Role of the 3'-untranslated region of human endothelin-1 in vascular endothelial cells. Contribution to transcript lability and the cellular heat shock response". *J. Biol. Chem.* 279 (10); 8655–8667.
- Mc. Cance, Kathry H, and Sue, E. 2006. *Pathophysiology* (5<sup>th</sup> ed). Mosby: Canada.
- Mi-Sun Kang, Jong-Suk Oh, In-Chol Kang, Suk-Jin Hong and Choong-Ho Choi, 2008. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *The Journal of Microbiology* 46 (6), 744-750,
- Moghadasian MH. 2002. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 70 (8): 855-865.
- Murray RK, Granner DK, Mayer PA, dan Rodwell VW. 1997. *Biokimia Harper*, ed. 24.: terjemahan Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Nakashima Y, H Fujii, S Sumiyoshi S, TN Wight, K Sueishi. 2007. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 986–989.

- Noureddine Idris-Khodja, Valérie Schini-Kerth. 2012. Thymoquinone improves aging-related endothelial dysfunction in the rat mesenteric artery. July, 385 (7): 749-758. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
- Ordóñez A J G *et al* 2003 *haematologica /journal of hematology* 88 (9).
- Orr AW, JM Sanders, M Bevard, E Coleman, IJ Sarembock, MA Schwartz. 2005. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *J Cell Biol.* 169: 191–202.
- Orwa , 2009. *Toona sureni* (Blume) Merr. Agroforestry Database.4; 1-5
- Pathak, S. B. *et al.*; Niranjana, K.; Padh, H.; Rajani, M. (2004). "TLC Densitometric Method for the Quantification of Eugenol and Gallic Acid in Clove". *Chromatographia* 60 (3 – 4): 241–244.
- Perrin DD, WLF Armarego and DR Perrin. 1980, *Purification of Laboratory Chemical*, 2nd Ed., Pergamon Press, New York.
- Ping T N, B Zhou, B Wang, RB Yu, J Ma. 2009. Flavonoids Intake and Risk of Lung Cancer: A Meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol* , 39(6): 352–359.
- Porth CM. 2007. *Essentials of pathophysiology*. 2<sup>th</sup> ed., pp. 347-354. Lippincott Williams & Wilkins.
- Pratt DE. (1992). Natural Antioxidants From Plant Material. In M.T. Huang, C.T. Ho & C.Y. Lee (Ed.). *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health*. Washington DC : American Society.
- Prasetyo A, U Sadhana and IP Miranti. 2000. Profil lipid dan ketebalan dinding arteri abdominalis tikus wistar pada injeksi inisial adrenalin intra vena (IV) dan diet kuning telur 'intermittent'. *Media Medika Indonesiana*. 35:3.
- Price SA and Lorraine. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis proses-proses Penyakit* (Ed 6) , Penerjemah: dr. Brahm U. Pendit, dr. Huriawati Hartanto, dr. Pita Wulansari dan dr. Dewi Asih Mahanani. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Reiterer G, T Michal and H Bernhard. 2004. Quercetin Protects Against Linoleic Acid-Induced Porcine Endothelial Cell Dysfunction. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 134:771-775.
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007. Pedoman Pewawancara Petugas Pengumpul Data. Jakarta: Badan Litbangkes, Depkes RI, 2007



- Robert L T, 2008. *Hyperlipidemia* . In DiPiro Joseph T A. Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach 7<sup>th</sup> ed., pp. 385-407 The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Robert O L, K Holmes, J Müller, DA Cross, MJ Cross. Dec 2009. "ERK5 and the regulation of endothelial cell function.". *Biochem Soc Trans.* 37 (6): 1254-1259.
- Rohatgi A, WO Andrew, K Amit, RA Colby, B Kamakki, RD Sandeep, DB Jarett , Darren K McGuire, James A de Lemos. 2009. Differential Associations Between Soluble Cellular Adhesion Molecules and Atherosclerosis in the Dallas Heart Study *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.29;1684
- Romy. 2009. Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol dan Hasil Fraksinasi Daun Surian (*Toona sureni* BL. Merr) secara in-vitro. Fakultas Farmasi, Universitas Andalas. Padang.
- Sarma A D *et. al.* 2010. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions. *International Journal of Pharma Sciences and Research* (IJPSR) 1(3): 185-192.
- Shami P J, JO Moore, JP Gockerman, JW Hathorn, MA Misukonis, JB Weinberg (1995). Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukemia cells. *Leuk. Res.* 19: 527-533
- Sastroamidjoyo S. 2001. *Obat Asli Indonesia*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Sauriasari R. 2006. Mengenal dan menangkak radikal bebas. *Artikel Iptek Bidang Biologi Pangan dan Kesehatan*.
- Setiati S. (2003). Radikal Bebas, Antioksidan dan Proses Menua. *Jurnal Kedokteran dan Farmasi*, 6, 366-369.
- Sherer Y & Yehuda Shoenfeld. 2006. *Mechanisms of Disease : atherosclerosis in autoimmune diseases*. Nature Clinical Practice Rheumatology 2: 99-106
- Shahidi F, 1997. *Natural antioxidants chemistry, health effects, and Applications*. Illinois by AOCS Press
- Silalahi J. 2005. Gas Nitrogen Oksida : polutan atau vital bagi kehidupan. *Cermin Dunia Kedokteran*, 14: 26-30.
- Simanjuntak P. 2006 . *Radikal Bebas dan Antioksidan*, Natural, Jakarta.

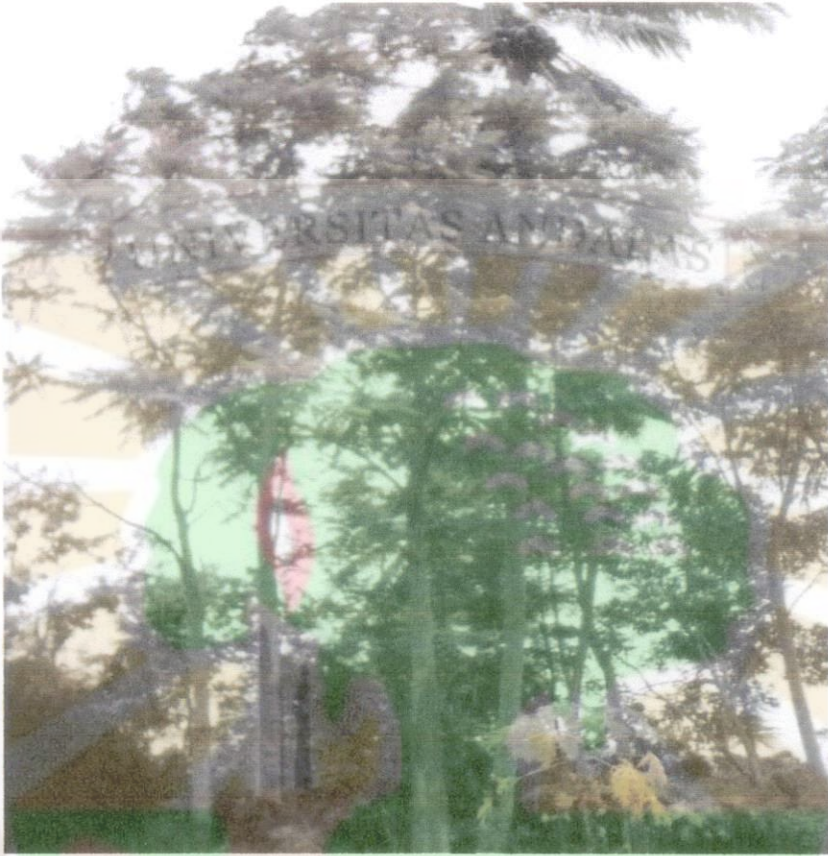
- Simionescu M. 2007. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 266–274.
- Sitompul Barita, 2003. Antioksidan dan Penyakit Aterosklerosis. *Medika*. No 6. Tahun ke XXIX
- Stahl E. 1969 , “*Thin Layer Chromatography*”. 2<sup>th</sup> ed., Academic Press INC., New York.
- Su Jeng-De , Toshihiko Osawa, Shunro Kawakishi, Mitsuo Namiki. 1988. Tannin antioxidants from *Osbeckia chinensis*, *Phytochemistry*, 27 (5): 1315–1319
- Sukandar YE, I Soediro, and BT Fambrene. 1998. *Pengaruh Eucheama SPP terhadap Kadar Kolesterol Darah Tikus Putih Galur Wistar*. 174-179. *Majalah Farmasi Indonesia*.
- Suhatri, Helmi Arifin , Hadira FLI. 2009 ,” Efek proteksi ekstrak daun surian (*Toona sureni* BL. Merr) terhadap gangguan fungsi sel endotel pembuluh darah tikus”, *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 14 (2): 17-24
- Syarif A, Dkk. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. (Edisi 5). Jakarta: bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Tavarini S, ED Innocenti, D Remorini, R Massai, L Guidi. 2008. Antioxidant Capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food chemistry*. 107: 282-288.
- Title, 2006. *Pharmacotherapy Handbook*, 6th Edition Copyright Â McGraw-Hill : 88-98
- Thomson EB, 1985. *Drug Bioscreening : Fundamental of drug Evaluation Techniques in Pharmacology*, Craseway Publishing Company, New York
- Trantas E, N Panopoulos and F Ververidis, 2009. "Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*". *Metabolic Engineering* Epub.
- Tsikas D. 2005. Analysis of the L-Arginine/Nitric Oxide Pathway: The Unique Role of Mass Spectrometry. *Current Pharmaceutical Analysis*, 1:15-30
- VerbeurenT J, 2006. Experimental Models of Thrombosis and Atherosclerosis. *Th rapie*. 61(5): 379-387



- Ververidis F, E Trantas, C Douglas, G Vollmer, G Kretzschmar, Panopoulos. October 2007. "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health". *Biotechnology Journal* 2 (10): 1214.
- Ververidis F, E Trantas, C Douglas, G Vollmer, G Kretzschmar, Panopoulos. October 2007. "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes". *Biotechnology Journal* 2 (10): 1235.
- Vogel HG. 2002. Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assay. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. page 1100.
- Weinberg PD . 2004. Rate-limiting steps in the development of atherosclerosis: the response-to-influx theory. *J Vasc Res.* 41: 1–17.
- Wu TC. 2007. "The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion." *Cancer Res.* 67 (13): 6003–6006.
- Xi H, M Akishita, K Nagai, W Yu, H Hasegawa, M Eto, *et al.* 2007. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 191: 281–289.
- Yamamoto, K Yasutomi , H Minoru, W Hirotaka, O Yoshihiro. 2008. In Vivo and In Vitro Inhibition of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Endothelial Adhesion Molecules by Eicosapentaenoic Acid. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 28:2173.
- Yang Y, and J Loscalzo. 2000. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cell by nitric oxide. American Heart Association, *Circulation Inc.* 101:2144.
- Yang HL, Chen SC, Lin KY, Wang MT, Chen YC, Huang HC, Cho HJ, Wang L, Kumar KJ, Hseu YC. 2011. Antioxidant activities of aqueous leaf extracts of *Toona sinensis* on free radical-induced endothelial cell damage. *J Ethnopharmacol.* 1;137(1):669-680.
- Zamblé A, Martin N F, Sahpaz S, Hennebelle T, Staels B, Bordet R, Duriez P, Brunet C, Bailleul F. 2008. Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthiana* roots. *J Ethnopharmacol.* 28;116(1):112-119.

## LAMPIRAN DESERTASI

### Lampiran 1. Gambar Tumbuhan Surian (*Toona sureni* BL. Merr)



Gambar 1. Tumbuhan Surian (*Toona sureni* BL. Merr)



**Lampiran 1 (lanjutan). Gambar Daun Surian (*Toona sureni* BL. Merr)**



Gambar 2. Daun Surian (*Toona sureni* Bl Merr.)





Lampiran 2. Identifikasi Tanaman Surian *T. sureni* dari Herbarium Universitas Andalas (ANDA)



## HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar  
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. \*811 e-mail: [nas\\_herb@yahoo.com](mailto:nas_herb@yahoo.com)

Nomor : 120/K-ID/ANDA/VII/2012  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada Yth,  
Dra. Suhatri, M.S. Apt.  
Di  
Padang

Dengan hormat,  
Sehubungan Permohonan Identifikasi Tumbuhan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa mahasiswa berikut:

Nama : Dra. Suhatri, M.S. Apt.  
NIM : 07 301 003  
Instansi : S3 Biomedic Ilmu Kedokteran Pasca Sarjana  
UNAND

Hasil identifikasi adalah:

No	Family	Spesies
1	Meliaceae	<i>Toona sureni</i> (Bl.) Merr.

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

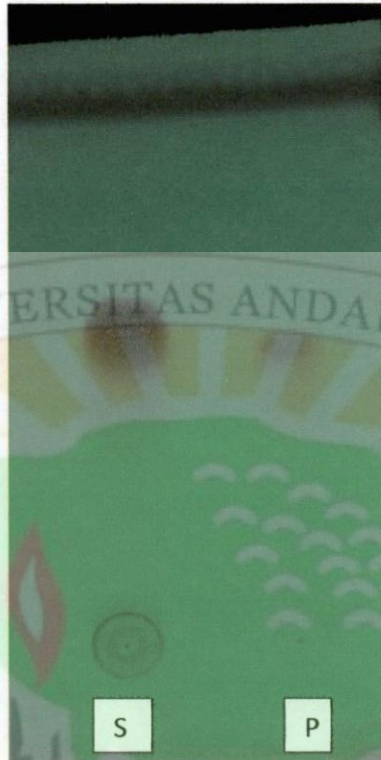
Padang, 17 Juli 2012

dan Kepala,

Nurainas, M.Si.  
NIP. 196908141995122001

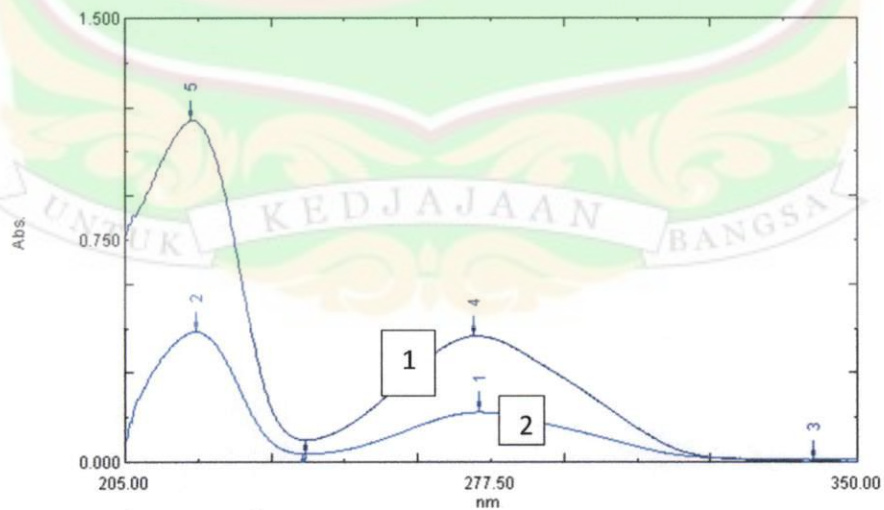
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

**Lampiran 3. Pemeriksaan Ekstrak terpurifikasi dari Subfraksi Fraksi Etil Asetat Daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)**



Keterangan: S= ekstrak terpurifikasi      P = asam galat

Gambar 3. Hasil KLT ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr) dengan eluen N-hexan : Etil Asetat 2:3



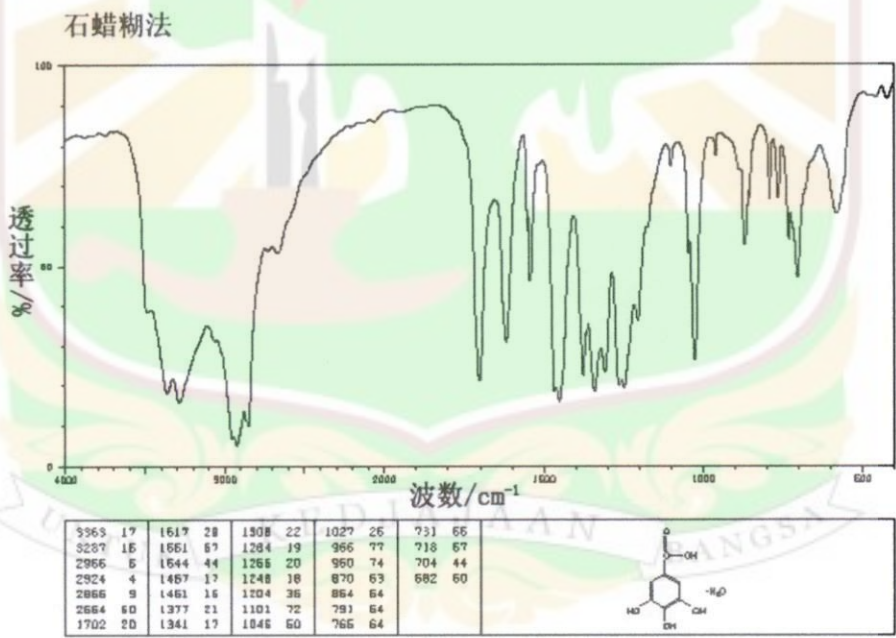
Keterangan: 1 = sampel  
2 = asam galat

Gambar 4. Spektrum UV ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni* BL Merr) dan asam galat.

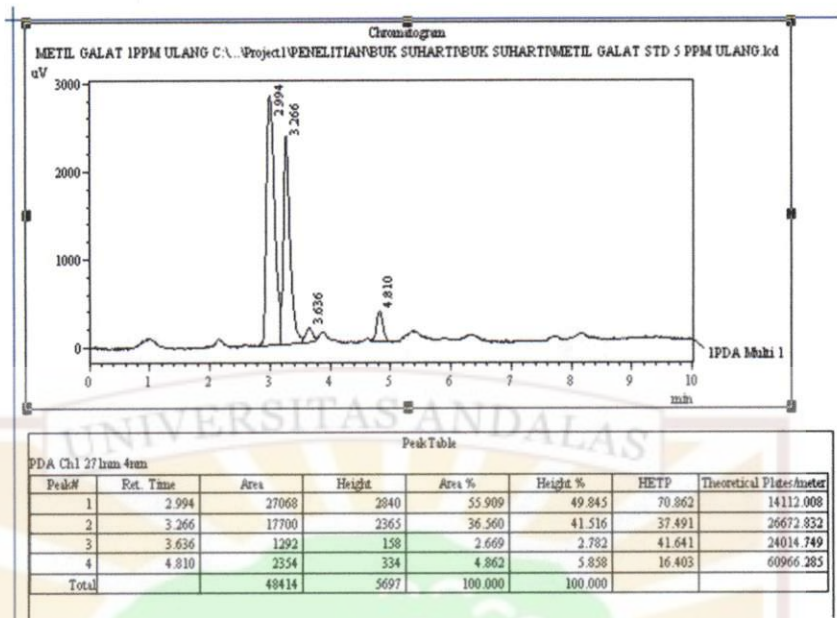




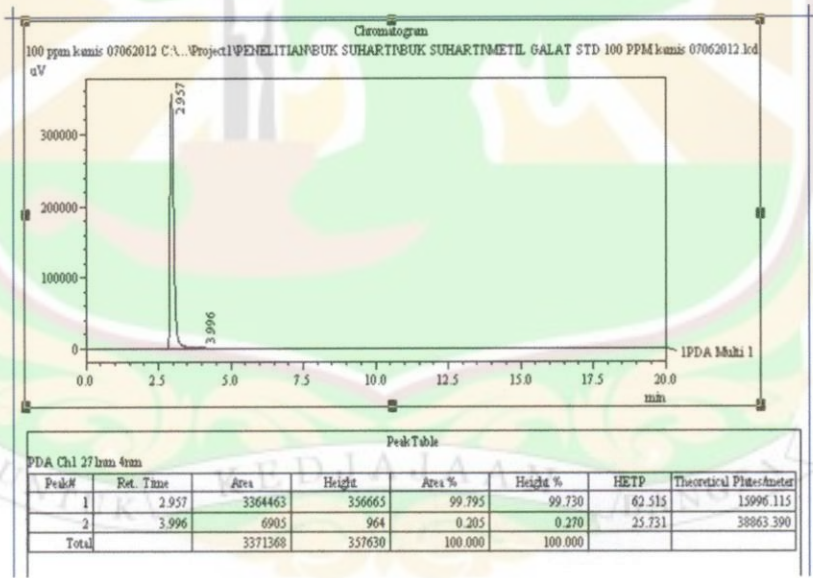
Gambar 5. Spektrum FT IR ekstrak terpurifikasi daun Surian (*Toona sureni* BL Merr)



Gambar 6. Spektrum IR asam galat standar ((Hirun, 2012)



Gambar 7. Kromatogram HPLC ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni* BLMerr

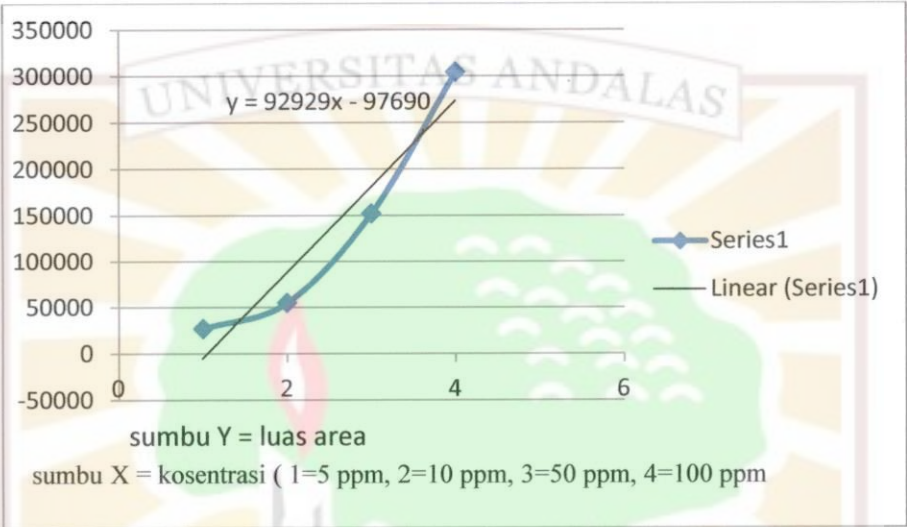


Gambar 8. Kromatogram HPLC metil galat



Tabel 1. Perhitungan Metil Galat dalam Ekstrak terpurifikasi

Konsetrasi	Waktu retensi	Luas area rata-rata
5 ppm	2,994	27068
10 ppm	2,973	54091
50 ppm	2,962	152140
100 ppm	2,957	304417



Gambar 9. Kurva regresi ekstrak terpurifikasi

Contoh perhitungan kadar metil galat yang terkandung dalam subfraksi etil asetat duan surian:

$$Y = 92929 X - 97690$$

Luas area metil galat dalam subfraksi etil asetat adalah 837480

Maka kadar metil galat yang terukur adalah

$$Y = 837480$$

$$837480 = 92929 X - 97690$$

$$92929 X = 837480 + 97690$$

$$X = 10.06 \text{ ppm}$$

Kadar metilgalat yang terukur adalah 10,06 ppm.

Kosentrasi larutan subfraksi etil asetat yang diukur adalah 10 mg dalam 50 ml methanol, berarti konsentrasinya adalah 200 ppm. Kemudian 1 ml diencerkan jadi 10 ml maka kosentrasinya  $1\text{ml}/10\text{ ml} \times 200 \text{ ppm} = 20 \text{ ppm}$ , maka kadar metil galat dalam ekstrak terpurifikasi adalah  $10,06 \text{ ppm}/20 \text{ Ppm} \times 100 \% = 50,3 \%$

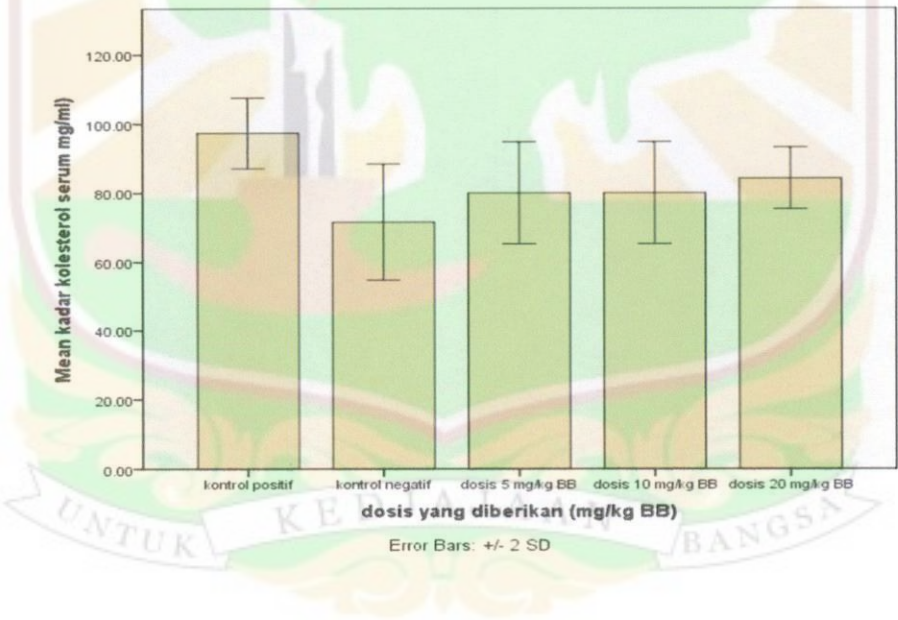


**Lampiran 3. Hasil Perhitungan Statistik Data-Data Efek Ekstrak terpurifikasi Daun Surian (*Toona Sureni BL Merr*)**

Tabel 1. Kadar Kolesterol Serum Tikus setelah pemberian Ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni BL Merr*)

No Hewan	kadar kolesterol dalam serum (mg/dl)				
	kontrol positif	kontrol negative	5 mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	95.33	79.62	72.18	80.90	89.32
2	95.39	78.78	83.02	80.32	87.88
3	100.84	60.35	72.33	85.30	84.69
4	104.03	65.43	88.71	91.36	72.03
5	91.06	73.61	83.55	83.02	93.49
Rata-rata ± SD	97,33 ± 5,11 <sup>c</sup>	71,56 ± 8,43 <sup>a</sup>	79,96 ± 3,7 <sup>ab</sup>	84,18 ± 1,99 <sup>b</sup>	85,48 ± 8,16 <sup>b</sup>

Keterangan: a,bdan c = Nilai dengan superskrip yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata p< 0,05)



Gambar 1. Diagram hubungan antara kadar kolesterol dengan dosis ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona Sureni BL Merr*)

Tabel 2. Analisa Statistic Bonteroni Hasil Pemeriksaan Kadar Kolesterol Serum

Multiple Comparisons							
Dependent Variable:kadar kolesterol serum mg/dl							
(I) dosis yang diberikan mg/kg BB		(J) dosis yang diberikan mg/kg BB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	kontrol positif	kontrol negative	26.57200*	4.45705	.000	12.5171	40.6269
		5 mg/kg BB	18.17200*	4.45705	.006	4.1171	32.2269
		10 mg/kg BB	13.95000	4.45705	.053	-.1049	28.0049
		20 mg/kg BB	12.64800	4.45705	.102	-1.4069	26.7029
	kontrol negative	kontrol positif	-26.57200*	4.45705	.000	-40.6269	-12.5171
		5 mg/kg BB	-8.40000	4.45705	.741	-22.4549	5.6549
		10 mg/kg BB	-12.62200	4.45705	.103	-26.6769	1.4329
		20 mg/kg BB	-13.92400	4.45705	.053	-27.9789	.1309
	5 mg/kg BB	kontrol positif	-18.17200*	4.45705	.006	-32.2269	-4.1171
		kontrol negative	8.40000	4.45705	.741	-5.6549	22.4549
		10 mg/kg BB	-4.22200	4.45705	1.000	-18.2769	9.8329
		20 mg/kg BB	-5.52400	4.45705	1.000	-19.5789	8.5309
	10 mg/kg BB	kontrol positif	-13.95000	4.45705	.053	-28.0049	.1049
		kontrol negative	12.62200	4.45705	.103	-1.4329	26.6769
		5 mg/kg BB	4.22200	4.45705	1.000	-9.8329	18.2769
		20 mg/kg BB	-1.30200	4.45705	1.000	-15.3569	12.7529
	20 mg/kg BB	kontrol positif	-12.64800	4.45705	.102	-26.7029	1.4069
		kontrol negative	13.92400	4.45705	.053	-.1309	27.9789
		5 mg/kg BB	5.52400	4.45705	1.000	-8.5309	19.5789
		10 mg/kg BB	1.30200	4.45705	1.000	-12.7529	15.3569

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 3. Kebermaknaan data kadar kolesterol serum tikus setelah diberi ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona sureni* BL Merr) dengan statistik Bonferroni

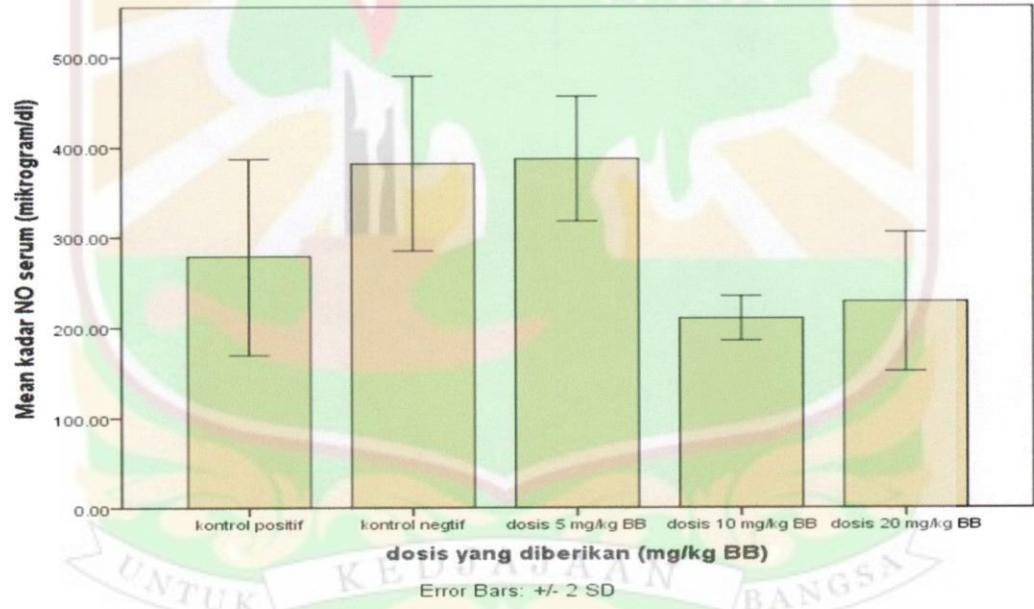
	Kontrol ( - )	Kontrol ( + )	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol ( - )	ns	0,00 <sup>s</sup>	0,741	0,103 <sup>ns</sup>	0,053 <sup>ns</sup>
Kontrol ( + )	0,000 <sup>s</sup>	ns	0,006 <sup>s</sup>	0,053 <sup>ns</sup>	0,102 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	0,741 <sup>ns</sup>	0,006 <sup>s</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	0,103 <sup>ns</sup>	0,053 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,053 <sup>ns</sup>	0,102 <sup>ns</sup>	1.000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns

Keterangan ns : no signifikan  
s : signifikan pada p < 0,005



Tabel 4. Data kadar nitrogen mono oksida (NO) setelah diberi ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni BL Merr*)

No Tikus	kadar NO (EDRF) dalam serum (mcg/dl)				
	kontrol positif	kontrol negative	5mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	222.57	433.55	424.86	219.74	275.23
2	231.73	311.78	330.97	226.06	200.76
3	355.53	369.34	386.02	201.52	244.53
4	270.93	421.79	403.32	200.50	240.92
5	307.90	371.56	388.36	200.66	178.45
rata-rata ± SD	278,33 ± 54,41	381,60± 48,57	386,74 ± 34,78	209,69± 12,26	227,97 ± 38,30



Gambar 2. Diagram hubungan antara kadar NO dengan dosis ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni BL Merr*)

Tabel 5. Analisa Statistic Bonteroni Hasil Pemeriksaan Kadar NO/EDRF Serum

Multiple Comparisons							
Dependent Variable:kadar NO/EDRF serum (mikrogram/ml)							
(I) dosis yang diberikan mg/kg BB		(J) dosis yang diberikan mg/kg BB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	kontrol positif	kontrol negative	-103.87200*	25.65898	.006	-184.7850	-22.9590
		dosis 5 mg/kg BB	-108.97400*	25.65898	.004	-189.8870	-28.0610
		dosis 10 mg/kg BB	68.03600	25.65898	.153	-12.8770	148.9490
		dosis 20 mg/B	49.75400	25.65898	.667	-31.1590	130.6670
	kontrol negative	kontrol positif	103.87200	25.65898	.006	22.9590	184.7850
		dosis 5 mg/kg BB	-5.10200	25.65898	1.000	-86.0150	75.8110
		dosis 10 mg/kg BB	171.90800*	25.65898	.000	90.9950	252.8210
		dosis 20 mg/B	153.62600*	25.65898	.000	72.7130	234.5390
	dosis 5 mg/kg BB	kontrol positif	108.97400	25.65898	.004	28.0610	189.8870
		kontrol negative	5.10200	25.65898	1.000	-75.8110	86.0150
		dosis 10 mg/kg BB	177.01000*	25.65898	.000	96.0970	257.9230
		dosis 20 mg/B	158.72800*	25.65898	.000	77.8150	239.6410
	dosis 10 mg/kg BB	kontrol positif	-68.03600	25.65898	.153	-148.9490	12.8770
		kontrol negative	-171.90800*	25.65898	.000	-252.8210	-90.9950
		dosis 5 mg/kg BB	-177.01000*	25.65898	.000	-257.9230	-96.0970
		dosis 20 mg/B	-18.28200	25.65898	1.000	-99.1950	62.6310
	dosis 20 mg/B	kontrol positif	-49.75400	25.65898	.667	-130.6670	31.1590
		kontrol negative	-153.62600*	25.65898	.000	-234.5390	-72.7130
		dosis 5 mg/kg BB	-158.72800*	25.65898	.000	-239.6410	-77.8150
		dosis 10 mg/kg BB	18.28200	25.65898	1.000	-62.6310	99.1950

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 6 Kebermaknaan Hasil Pengukuran Kadar NO dengan Analisis statistik Bonferroni

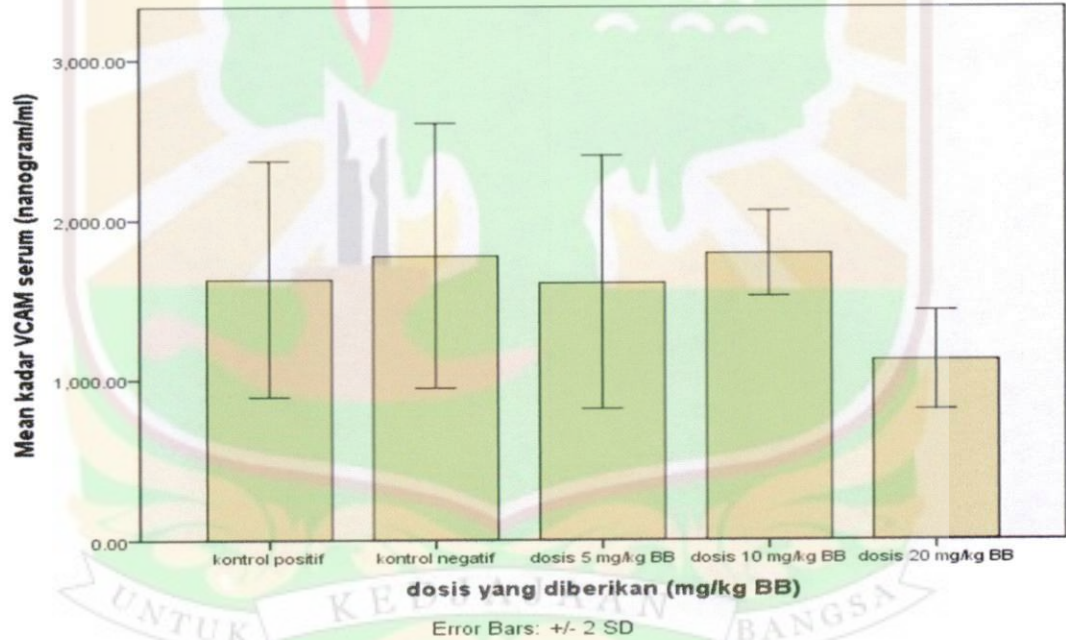
	Kontrol ( - )	Kontrol ( + )	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol ( - )	ns	0,006 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Kontrol ( + )	0,006 <sup>s</sup>	ns	0,004 <sup>s</sup>	0,153 <sup>ns</sup>	0,667 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>s</sup>	ns	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	0,000 <sup>s</sup>	0,153 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,000 <sup>s</sup>	0,006 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns

Keterangan ns : no signifikan  
s : signifikan pada p < 0,005



Tabel 7. Data kadar VCAM serum setelah diberi ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni BL Merr*)

No Tikus	kadar VCAM Dalam Serum (microgram/dl)				
	Kontrol positif	Kontrol negatif	dosis 5 mg/kg BB	dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
1	1543.56	1708.74	1261.78	1815,63	970.28
2	1708.74	2000.24	1912.79	1980.01	1009.15
3	2136.27	1135.46	1893.36	1611.58	1368.66
4	1106.31	2243.16	1096.60	1747.61	1135.46
5	1650.44	1786.48	1873.93	1798.91	1130.89
Rata-rata ± SD	1629.06 ±369.00	1774.82 ± 413.35	1607.69 ± 395.74	1790.91 ±133.01	1122.89 ±155.60



Gambar 3. Diagram hubungan antara kadar VCAM dengan dosis senyawa ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona Sureni BL Merr*)

Tabel 8. Analisa Statistic Bonferroni Hasil Pemeriksaan Kadar VCAM Serum

Multiple Comparisons							
Dependent Variable:kadar VCAM mikrogram/dl							
	(I) dosis yang diberikan BB	(J) dosis yang diberikan mg/kg BB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	kontrol positif	kontrol negative	-145.75200	201.08950	1.000	-779.8677	488.3637
		dosis 5 mg/kg BB	21.37200	201.08950	1.000	-612.7437	655.4877
		dosis 10 mg/kg BB	-161.68400	201.08950	1.000	-795.7997	472.4317
		dosis 20 mg/kg BB	506.17600	201.08950	.205	-127.9397	1140.2917
	kontrol negative	kontrol positif	145.75200	201.08950	1.000	-488.3637	779.8677
		dosis 5 mg/kg BB	167.12400	201.08950	1.000	-466.9917	801.2397
		dosis 10 mg/kg BB	-15.93200	201.08950	1.000	-650.0477	618.1837
		dosis 20 mg/kg BB	651.92800	201.08950	.041	17.8123	1286.0437
	dosis 5 mg/kg BB	kontrol positif	-21.37200	201.08950	1.000	-655.4877	612.7437
		kontrol negative	-167.12400	201.08950	1.000	-801.2397	466.9917
		dosis 10 mg/kg BB	-183.05600	201.08950	1.000	-817.1717	451.0597
		dosis 20 mg/kg BB	484.80400	201.08950	.257	-149.3117	1118.9197
	dosis 10 mg/kg BB	kontrol positif	161.68400	201.08950	1.000	-472.4317	795.7997
		kontrol negative	15.93200	201.08950	1.000	-618.1837	650.0477
		dosis 5 mg/kg BB	183.05600	201.08950	1.000	-451.0597	817.1717
		dosis 20 mg/kg BB	667.86000	201.08950	.034	33.7443	1301.9757
	dosis 20 mg/kg BB	kontrol positif	-506.17600	201.08950	.205	-1140.2917	127.9397
		kontrol negative	-651.92800	201.08950	.041	-1286.0437	-17.8123
		dosis 5 mg/kg BB	-484.80400	201.08950	.257	-1118.9197	149.3117
		dosis 10 mg/kg BB	-667.86000	201.08950	.034	-1301.9757	-33.7443

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 9. Kebermaknaan Hasil Pengukuran Kadar VCAM-1 dengan Analisa Statistik Benferroni

	Kontrol ( - )	Kontrol ( + )	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol ( - )	ns	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0.041 <sup>s</sup>
Kontrol ( + )	1,000 <sup>ns</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,205 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	0,257 <sup>ns</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	0,034 <sup>s</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,041 <sup>s</sup>	0,205 <sup>ns</sup>	0,257 <sup>s</sup>	0,034 <sup>s</sup>	ns

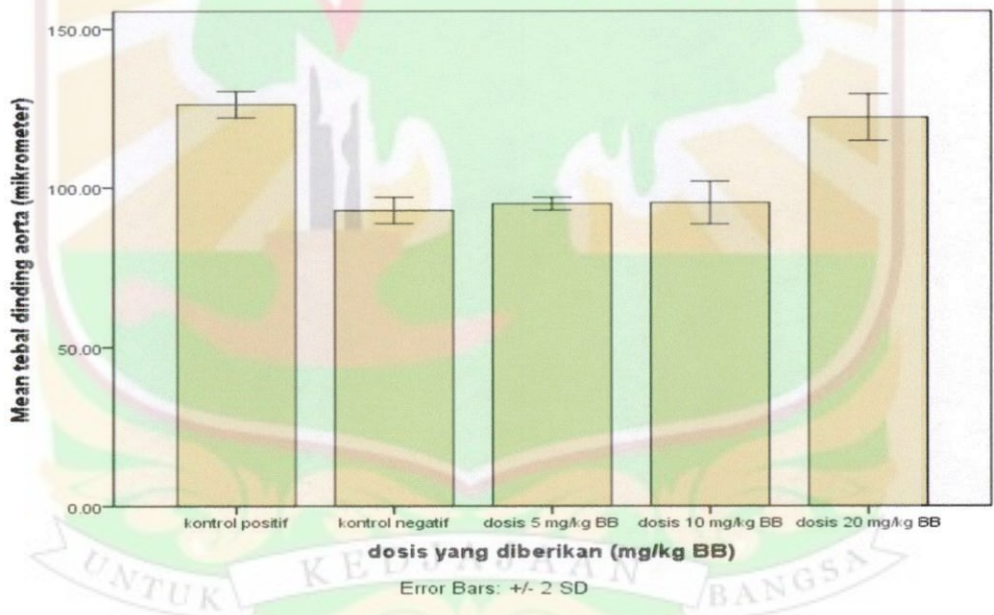
Keterangan ns : no signifikan

s : signifikan pada p < 0,005



Tabel 10. Tebal dinding pembuluh darah aorta setelah diberi ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona sureni* BL Merr)

No Hewan	Tebal dindin aorta (µm)				
	kontrol positif	kontrol negative	5 mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	128.80	92.29	95.29	91.33	127.80
2	125.60	94.50	93.58	97.51	121.30
3	127.80	90.16	94.11	93.11	123.50
4	123.50	95.19	96.08	99.66	119.50
5	125.60	91.83	95.21	94.43	118.60
Rata-rata ± SD	126.26 ± 2.08	92.79 ± 2.05	94.85 ± 0.99	95.21 ± 0.45	122.14 ±1.64



Gambar 4. Grafik hubungan keadaan lapisan sel endotelia aorta dengan dosis ekstrak terpurifikasi daun surian (*Toona sureni* BL Merr)

Tabel 11. Analisa Statistic Bonteroni Hasil Pemeriksaan Tebal dinding pembuluh darah aort

Multiple Comparisons							
Dependent Variable:tebal dinding aorta (mikrometer)							
	(I) dosis yang diberikan (mg/kg BB)	(J) dosis yang diberikan (mg/kg BB)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferro ni	kontrol positif	kontrol negative	33.46600*	1.65734	.000	28.2398	38.6922
		dosis 5 mg/kg BB	31.40600*	1.65734	.000	26.1798	36.6322
		dosis 10 mg/kg BB	31.05200*	1.65734	.000	25.8258	36.2782
		dosis 20 mg/kg BB	4.12000	1.65734	.219	-1.1062	9.3462
	kontrol negative	kontrol positif	-33.46600*	1.65734	.000	-38.6922	-28.2398
		dosis 5 mg/kg BB	-2.06000	1.65734	1.000	-7.2862	3.1662
		dosis 10 mg/kg BB	-2.41400	1.65734	1.000	-7.6402	2.8122
		dosis 20 mg/kg BB	-29.34600*	1.65734	.000	-34.5722	-24.1198
	dosis 5 mg/kg BB	kontrol positif	-31.40600*	1.65734	.000	-36.6322	-26.1798
		kontrol negative	2.06000	1.65734	1.000	-3.1662	7.2862
		dosis 10 mg/kg BB	-.35400	1.65734	1.000	-5.5802	4.8722
		dosis 20 mg/kg BB	-27.28600*	1.65734	.000	-32.5122	-22.0598
	dosis 10 mg/kg BB	kontrol positif	-31.05200*	1.65734	.000	-36.2782	-25.8258
		kontrol negative	2.41400	1.65734	1.000	-2.8122	7.6402
		dosis 5 mg/kg BB	.35400	1.65734	1.000	-4.8722	5.5802
		dosis 20 mg/kg BB	-26.93200*	1.65734	.000	-32.1582	-21.7058
	dosis 20 mg/kg BB	kontrol positif	-4.12000	1.65734	.219	-9.3462	1.1062
		kontrol negative	29.34600*	1.65734	.000	24.1198	34.5722
		dosis 5 mg/kg BB	27.28600*	1.65734	.000	22.0598	32.5122
		dosis 10 mg/kg BB	26.93200*	1.65734	.000	21.7058	32.1582

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 12 Analisa Kebermaknaan Hasil Pengukuran Tebal Aorta secara Statistik Benferroni

	Kontrol ( - )	Kontrol ( + )	Dosis 5 mg/kg BB	Dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
Kontrol (-)	ns	0,000 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Kontrol (+)	0,000 <sup>s</sup>	ns	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	0,219 <sup>ns</sup>
Dosis 5 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	ns	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>
Dosis 10 mg/kg BB	1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>s</sup>	1,000 <sup>ns</sup>	ns	0,000 <sup>s</sup>
Dosis 20 mg/kg BB	0,000 <sup>s</sup>	0,219 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	0,000 <sup>s</sup>	ns

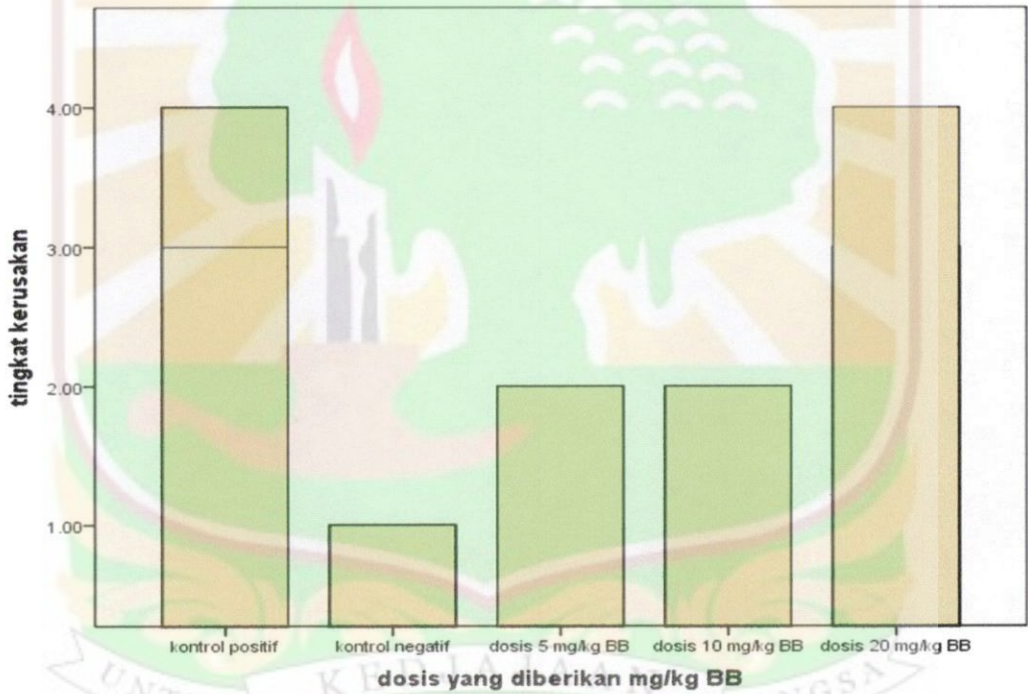
Keterangan ns : no signifikan

s : signifikan pada  $p < 0,005$



Tabel 13. Tingkat kerusakan sel endotel pembuluh darah aorta setelah diberi Ekstrak terpurifikasi daun Surian(*Toona sureni* BL Merr)

No Tikus	Tingkat Kerusakan endotel Pembuluh Darah Aorta				
	Kontrol negative	Kontrol Positif	dosis 5 mg/kg BB	dosis 10 mg/kg BB	Dosis 20 mg/kg BB
1	1	4	1	2	3
2	1	4	2	2	3
3	1	4	1	1	2
4	1	4	1	2	3
5	1	3	2	2	4



Gambar 5. Grafik hubungan keadaan lapisan sel endotelia aorta dengan dosis ekstrak terpurifikasi daun surian(*Toona sureni* BL Merr)

Tabel 14. Analisa Kruskal-Wallis Test Hasil Pemeriksaan kerusakan lapisan endotel dinding pembuluh darah aorta

Kruskal-Wallis Test

Ranks

VAR00007		N	Mean Rank
VAR00002	1.00	5	5.00
	2.00	5	22.10
	3.00	5	8.20
	4.00	5	11.40
	5.00	5	18.30
Total		25	

Test Statistics(a,b)

	VAR00002
Chi-Square	20.100
Df	4
Asymp. Sig.	.000

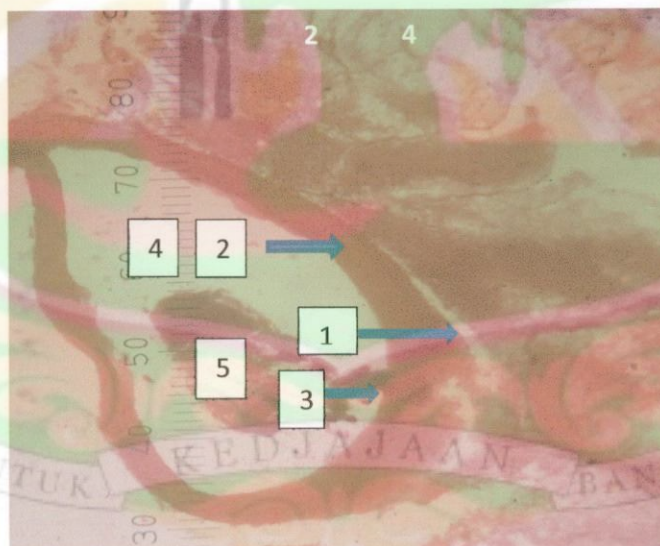
a Kruskal Wallis Test  
b Grouping Variable: VAR00007



**Lampiran 4. Foto Mikroskopis Preparat Histopatologi Pembuluh Aorta Tikus putih Jantan .**



Gambar 1. Gambar histopatologi pembuluh aorta hewan yang diberi MLT dan PTU (Kontrol positif) (1) tunika adventisia, (2) tunika media (3) tunika intima (4) lumen.(5) gumpalan darah .Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



Gambar 2. Gambar histopatologi pembuluh aorta hewan normal ( kontrol negatif) (1) tunika adventisia, (2) tunika media (3) tunika intima (4) lumen.(5) gumpalan darah .Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.

**Lampiran 4. Foto Mikroskopis Preparat Histopatologi Pembuluh Aorta Tikus putih Jantan .**



Gambar 3. Pembuluh aorta hewan yang diberi MLT dan PTU juga diberi ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 5 mg/Kg BB. (1) tunika adventisia, (2) tunika media (3) tunika intima (4) lumen.(5) gumpalan darah .Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



Gambar 4. Gambar hisptoatologi pembuluh aorta hewan yang diberi MLT dan PTU juga diberi senyawa ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 10 mg/Kg BB. (1) tunika adventisia, (2) tunika media (3) tunika intima (4) lumen.(5) gumpalan darah .Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



**Lampiran 4. Foto Mikroskopis Preparat Histopatologi Pembuluh Aorta Tikus putih Jantan.**

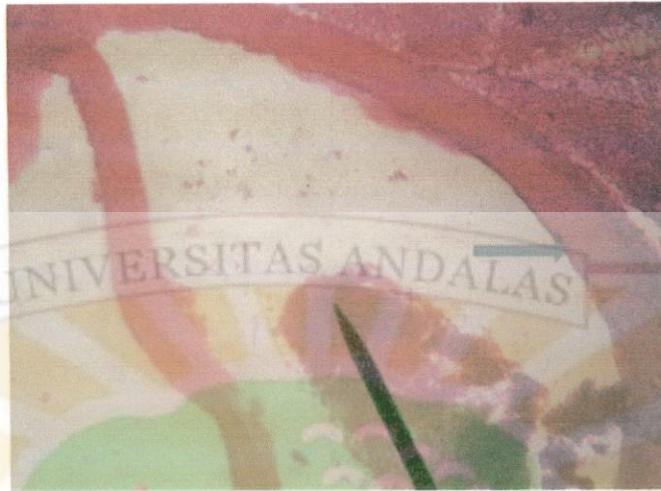


Gambar 5. Gambar hispatologi pembuluh aorta hewan yang diberi MLT dan PTU juga diberi ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 20mg/Kg BB. (1) tunika adventisia, (2) tunika madia (3) tunika intima (4) lumen.(5) gumpalan darah .Pembesaran mikroskop  $4 \times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



Gambar 6. Gambar hispatologi pembuluh aorta tikus putih yang diberi MLT dan PTU (kontrol positif). Terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotelial yang terputus. Pembesaran mikroskop  $4 \times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.

**Lampiran 4. Foto Mikroskopis Preparat Histologi Pembuluh Aorta Tikus putih Jantan .**



Gambar 7. Gambar hispatologi pembuluh aorta tikus putih kontrol negatif (normal). Terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotelial yang utuh. Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



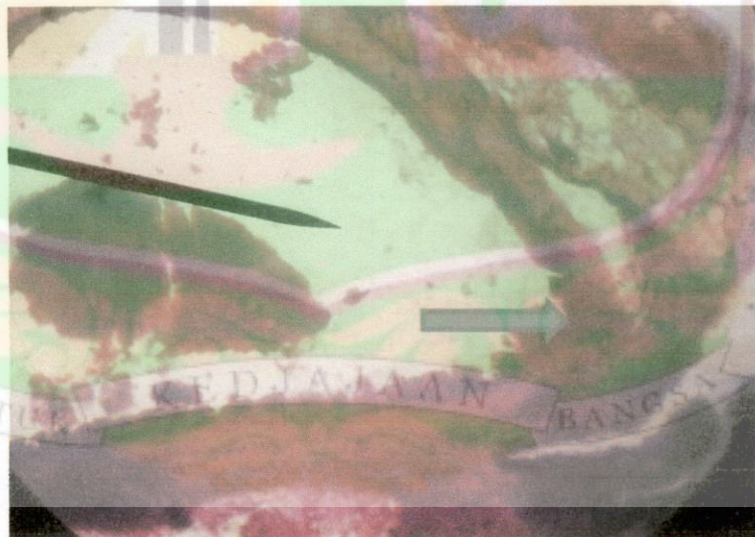
Gambar 8. Gambar hispatologi pembuluh aorta tikus putih yang diberi MLT dan PTU juga diberi ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 5 mg/Kg BB. Terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotelial yang tetap utuh. Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



**Lampiran 4. Foto Mikroskopis Preparat Histologi Pembuluh Aorta Tikus putih Jantan .**



Gambar 9. Gambar hispatologi pembuluh aorta tikus putih yang diberi MLT dan PTU juga diberi ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 10 mg/Kg BB. Terlihat lapisan sel endotelial yang masih utuh. pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.



Gambar 10. Gambar hispatologi pembuluh aorta tikus putih yang diberi MLT dan PTU juga diberi ekstrak terpurifikasi daun surian dosis 20 mg/Kg BB. Terlihat tunika intima dengan lapisan sel endotelial yang terputus-putus. Pembesaran mikroskop  $4\times 10$ , 4 kali zoom kamera 14 MP.

## **SURAT KETERANGAN**

Ketua Laboratorium Struktur Perkembangan Hewan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas dengan ini menyatakan bahwa Preparat hasil Histopatologi dari Pembuluh Aorta Tikus Putih Jantan hasil Penelitian dari Mahasiswa yang tersebut namanya dibawah ini :

Nama : **Dra. Suhatri, MS, Apt**

No. BP : **07301003**

Fakultas : **Pascasarjana Program Biomedik Fak. Kedokteran**

telah dibacakan dengan seksama oleh ahlinya.

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.



Rundung, 09 Agustus 2012

Ketua Laboratorium Struktur Perkembangan Hewan,

**Dra. Netty Marusin, MS**

**NIP. 19480920 197710 2 001**

UNTUK

KEDJAJAAN

BANGSA